

**FERNANDA GUIMARÃES**

**Seleção de bactérias lácticas do leite de transição bovino  
fermentado e efeito antagônico frente a *Escherichia coli* e  
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

**Área de Concentração:** Produção Animal

**Orientador:** Eduardo Robson Duarte

**Coorientadores:**  
Roberta Torres Careli  
Maximiliano Soares Pinto

MONTES CLAROS  
2017

Nº  
Cutte  
Ano

Gumarães, Fernanda.

Seleção de bactérias lácticas do leite de transição bovino fermentado e efeito antagônico frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*/ Fernanda Guimarães. Montes Claros: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

61 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção animal e qualidade de alimentos de origem animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Eduardo Robson Duarte

Banca examinadora: Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier, Rafael Alves de Azevedo, Anna Cristina de Almeida.

Inclui referências: f. 21-25, 37-39, 54-57.

1. Bactérias lácticas. 2. Leite de transição. 3. *Staphylococcus aureus*. I. Eduardo Robson Duarte. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: XXX

**Fernanda Guimarães**

**Seleção de bactérias lácticas do leite do transição bovino fermentado e efeito antagônico frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Qualidade de Alimentos de Origem Animal.

Orientador: Eduardo Robson Duarte

Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier  
UNIMONTES

Prof. Rafael Alves de Azevedo  
UFMG/ICA

Profa. Anna Cristina de Almeida  
UFMG/ICA

---

Prof. Eduardo Robson Duarte

ICA/UFMG  
Montes Claros, 08 de agosto de 2017

## AGRADECIMENTO

A Deus pelo dom da minha vida, pela sua presença constate nos momentos de dificuldade, pela força e amparo que Ele me concedeu e concede todos os dias. Muito obrigada Senhor.

Aos meus pais e irmãos, pela compreensão.

Ao meu orientador Eduardo Robson, que sempre esteve tão disposto a me ajudar, pelas suas correções, pela sua paciência, pela sua motivação e pelo prazer que ele tem de ensinar. Muito obrigada Eduardo, aprendi muito com você e os seus ensinamentos foram de suma importância para minha formação.

A minha coorientadora Roberta Careli, pelos ensinamentos, confiança e amizade. Também aprendi muito com você.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICA).

A todos aqueles que me ajudaram durante as pesquisas direta ou indiretamente, em especial a Lílian, Andressa, Bianca, Valdo, Katy, Max, Paloma, Suzi e todos do laboratório de pesquisa de ecologia microbiana.

A CAPES e FAPEMIG, pela concessão de bolsa.

E a todos aqueles que contribuíram para minha formação, crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada!

“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará.”

SI 22

## RESUMO

Bactérias ácido lácticas (BAL) produzem substâncias que podem auxiliar no controle de doenças bacterianas e inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos. A atividade antibacteriana dessas bactérias é de grande interesse na saúde animal e humana e nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, pois podem reduzir o uso de antimicrobianos convencionais. O gênero *Lactobacillus* é um dos mais estudado por produzir bacteriocinas que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O objetivo neste estudo foi avaliar o potencial inibitório *in vitro* de bactérias ácido lácticas provenientes do leite de transição fermentado de bovinos contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de origem bovina. Em um primeiro estudo, bactérias ácido lácticas foram isoladas do leite de transição bovino fermentado durante 141 dias em garrafas vedadas. As amostras foram submetidas a análises físico-químicas de pH e acidez titulável e análises microbiológicas para quantificação de bactérias lácticas (BAL), enterobactérias, fungos e leveduras. Bactérias isoladas foram identificadas presuntivamente em galeria API, avaliadas quanto a capacidade de fermentação do leite, tolerância ao pH gástrico e aos sais biliares, e antagonismo frente a *Escherichia coli*. As amostras do leite fermentado apresentaram elevada contagem de bactérias lácticas e baixa contagem de *S. aureus*. Três estirpes foram identificadas como *Lactobacillus brevis* e resistiram ao pH ácido e a sais biliares. Entretanto apenas *Lactobacillus brevis* (A1) apresentou efeito antagônico. No segundo experimento, bactérias ácido lácticas foram isoladas de leite do transição bovino fermentado durante 33 dias. As BALs isoladas foram identificadas por análise proteômica e avaliadas quanto à sensibilidade a antimicrobianos, antagonismo frente *S. aureus* e eficiência de inibição de biofilme aderido em superfície de aço inoxidável e borracha de teteira. Entre os isolados de BAL avaliados foram identificados *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, e *Enterococcus* spp.. Essas bactérias foram sensíveis a cinco antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite bovina e resistente??. Do total de 15 isolados de BAL, nove apresentaram zonas de inibição frente a duas amostras de *S. aureus* em teste de difusão em ágar por sobrecamada. As eficácias de redução desses biofilmes variaram entre 12 a 15% nas superfícies de aço e de borracha respectivamente. Os resultados indicam que BALs provenientes do leite de transição fermentado possuem efeitos inibitórios frente a *E. coli* e *S. aureus* apresentando potencial para produção de substâncias alternativas para redução de biofilme de *S. aureus* e para elaboração de probióticos para o controle de controle de diarreias em bezerros, .

Palavras-chave: Mastite. Colibacilose. Antagonismo. Biofilme. *Lactobacillus* spp.

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (BALs) produce substances that can aid in the control of bacterial diseases and inhibit the growth of pathogenic and deteriorating microorganisms in food. The antibacterial activity of these bacteria is of great interest in animal and human health in the pharmaceutical and food industries, as they may reduce the use of conventional antimicrobials. The genus *Lactobacillus* is one of the most studied for producing bacteriocins that inhibit the growth of pathogenic microorganisms like *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The objective of this study was to evaluate the in vitro inhibitory potential of lactic acid bacteria from bovine fermented transition milk against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of bovine origin. For article I, lactic acid bacteria were isolated from fermented bovine transition milk anaerobically for 141 days. The samples were submitted to physical-chemical analysis of pH and titratable acidity and microbiological analyzes for quantification of lactic bacteria, enterobacteria, fungi and yeasts. Bacteria isolated were presumptively identified in the API gallery, evaluated for fermentation capacity, their probiotic potential in vitro by tolerance to gastric pH and bile salts, and antagonism to *Escherichia coli*. The samples had high lactic acid counts and low *S. aureus* counts. Three strains were identified as *Lactobacillus brevis* and resisted at acid pH and bile salts. However, only *Lactobacillus brevis* (A1) presented an antagonistic effect. For article II, lactic acid bacteria were isolated from fermented bovine transition milk anaerobically for 33 days. Bacteria isolated were identified by proteomic analysis and evaluated for antimicrobial susceptibility, *S. aureus* antagonism and biofilm inhibition efficiency adhered to stainless steel surface and teat rubber. Among the BAL isolates evaluated, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Enterococcus* spp. Were identified. These bacteria were sensitive to five antimicrobials used in the treatment of bovine mastitis. From the total of 15 isolates of BAL, nine showed zones of inhibition against two samples of *S. aureus* in diffusion test in agar by overlay. . The reduction efficiencies of these biofilms ranged from 12 to 15% on the steel and rubber surfaces respectively. The results indicate that BAL from fermented transition milk have inhibitory effects against *E. coli* and *S. aureus* and may represent an alternative source for the control of diarrhea in calves, biofilm reduction and prevention of mastitis control in cattle.

Key words: Mastitis. Colibacillose. Antagonism. Biofilm. *Lactobacillus* spp.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas .....	16
ARTIGO I	
Tabela 1- Concentração média de diferentes morfotipos de colônias de bactérias lácticas provenientes de silagem do leite de transição de acordo com o dia de coleta, após o parto de vacas Holandesas, expressas em log UFC/mL.....	33
Tabela 2- Análise das características, aspecto, odor, coágulo (cm), pH e acidez do leite de transição inoculado e fermentado por seis isolados de <i>Lactobacillus</i> spp.....	34
Tabela 3- Resistência de isolados de três morfotipos de bactérias lácticas provenientes de colostro bovino fermentado em pH 3, 4, 5 e 7 e a sais biliares nas concentrações 0, 0,3, 0,5, e 1%.....	35
ARTIGO II	
Tabela 1- Espécies de bactérias ácido lácticas isoladas do leite de transição fermentado identificadas pela técnica de Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF MS).....	46
Tabela 2- Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias ácido lácticas isoladas do leite de transição bovino fermentado.....	47
Tabela 3- Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de bactérias ácido lácticas provenientes do leite de transição fermentado contra <i>Staphylococcus aureus</i> (SA 178) e cepa padrão (SA ATCC 25923).....	48
Tabela 4- Concentração de <i>Staphylococcus aureus</i> aderidos em cupons de aço e borracha de teteiras após o contato de 10 e 20 minutos com o sobrenadante de três estirpe de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados do leite de transição fermentado.....	51



## LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Cultura de Coleção Tipo Americano)
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
CCS	Contagem de Células Somáticas
°C	Graus Celsius
%	Por cento
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture/World Health Organization</i>
G	Grama
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MG	Minas Gerais
mL	Mililitros
µL	Microlitros
MRS	<i>Man Rogosa e Sharpe</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos.....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1	Leite de transição fermentado de forma anaeróbica.....	14
3.2	Bactérias ácido lácticas.....	15
3.3	Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas.....	15
3.4	Bacteriocina.....	16
3.5	Biofilmes de <i>Staphylococcus spp.</i> e sobrenadante de bactérias ácido laticas.....	17
3.6	<i>Staphylococcus spp.</i> em bovinos.....	18
3.7	Resistência de <i>staphylococcus spp.</i> a antimicrobianos.....	19
3.8	Colibacilose.....	20
3.9	Referências.....	21
<b>4</b>	<b>ARTIGO(S)</b> .....	26
4.1	Artigo 1- Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes do leite de transição bovino fermentado.....	26
4.2	Artigo 2- Antagonismo e inibição de biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> por sobrenadantes de <i>Lactobacillus spp.</i> provenientes do leite de transição fermentado.....	40
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	58
	<b>APÊNDICES</b> .....	59
	<b>ANEXOS</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

Muitas doenças que acometem os animais de produção e os humanos são ocasionadas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para o tratamento das doenças ocasionadas por essas bactérias têm se utilizado intensamente antimicrobianos, que favorecem a seleção de bactérias resistentes, dificultando ainda mais o tratamento. Por isso é necessário pesquisar tratamentos alternativos para a redução da utilização desses fármacos antibacterianos (BOUCHARD *et al.*, 2015).

*Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) ocasiona colibacilose em bezerros, doença infectocontagiosa que ocorre frequentemente em animais mais jovens, nos primeiros dias de vida, desencadeando diarreia e frequentemente morte (SALVADORI *et al.*, 2003). Para o tratamento e controle dessa doença, são frequentemente administrados antibacterianos. No entanto, a toxicidade, alergias e o favorecimento à resistência têm fomentado o interesse por probióticos, como alternativa à antibioticoterapia (DUSE *et al.*, 2015).

Outro microrganismo envolvido em doenças no rebanho bovino é o *S. aureus*, um dos principais causadores de mastite e contaminação do leite. Algumas estirpes são capazes de produzir biofilmes em superfícies que entram em contato com o alimento (LEE *et al.*, 2014) e enterotoxinas termoestáveis, apresentando risco à saúde pública (VIÇOSA *et al.*, 2010). Além disso, a frequente utilização de antibióticos favorece a seleção de cepas resistentes a diferentes grupos de antibacterianos (SAEKI *et al.*, 2011).

Para reduzir o uso de antimicrobianos, alternativas naturais tem se mostrado eficientes na inibição de microrganismos patogênicos. Algumas estirpes de *Lactobacillus* spp. apresentam capacidade de reduzir a formação de biofilmes de *S. aureus* (HOR; LION, 2014). Além disso, *Lactobacillus* spp. tem contribuído para melhorar a saúde de bezerros recém-nascidos (MALDONADO *et al.*, 2012; BAYATKOUHSARA *et al.*, 2013).

Esse gênero de BAL foi identificado em colostro e leite de transição fermentado bovino durante 360 dias (SAALFELD *et al.*, 2013) e podem ser avaliados quanto ao potencial inibitório de patógenos. A secreção da glândula mamária produzida nas primeiras horas após o parto é definida como colostro e com o passar do tempo essa secreção passa por transformações até atingir o percentual nutricional do leite, a secreção produzida nesse período de transformações é denominada como leite de transição (AZEVEDO *et al.*, 2014). Essa matéria prima pode ser conservada em acondicionamento anaeróbico em garrafas de plástico de politereftalato de etilenotipo (PET), técnica conhecida como silagem de colostro (SAALFELD, 2008). Esse processo de armazenamento é simples e dependente de bactérias lácticas (BAL) que estão naturalmente presentes nessas secreções (SAALFELD, 2008; AZEVEDO; DUARTE, 2013).

Bactérias ácido lácticas (BAL) tem sido estudadas por produzirem ácidos orgânicos, bacteriocinas (CHEN *et al.*, 2014) e peróxido de hidrogênio (BOUCHARD *et al.*, 2015) que são capazes de inibir o crescimento de patógenos (GUEDES NETO *et al.*, 2005). Dessa forma BAL

podem ser utilizadas na inibição de microrganismos patogênicos como *E. coli* e *Staphylococcus aureus*.

Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos da utilização de BAL do leite de transição bovino fermentado como inibidores de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* provenientes de animais com mastite ou com colibacilose. Os compostos antimicrobianos como as bacteriocinas produzidas por BAL poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de novos antimicrobianos, antissépticos e sanitizantes, podendo representar importante alternativa ao uso de antimicrobianos convencionais, reduzindo os efeitos adversos desses antibacterianos e a pressão de seleção em cepas bacterianas resistentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial inibitório *in vitro* de bactérias ácido lácticas provenientes do leite de transição fermentado de bovinos contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de origem bovina

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar, identificar e quantificar bactérias ácido lácticas (BAL) provenientes do leite de transição fermentado.
- Avaliar o potencial fermentativo de cepas isoladas do leite de transição
- Caracterizar as BAL quanto à resistência ao suco gástrico e sais biliares.
- Determinar a capacidade de inibição de BAL avaliadas contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus* por métodos de antagonismo *in vitro*.
- Avaliar o potencial de adesão e biotransferência de *S. aureus*.
- Avaliar a eficácia de sobrenadantes de BAL frente a biofilmes de *Staphylococcus aureus* aderidos em aço inoxidável e borracha de teteira de ordenha mecânica.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Leite de transição fermentado

A primeira secreção da glândula mamária é denominada colostro (MACHADO NETO *et al.*, 2004), a partir da segunda ordenha essa secreção passa por transformações nutricionais diminuindo a quantidade de alguns nutrientes e aumentando a quantidade de outros até atingir a composição do leite (AZEVEDO *et al.*, 2014). Durante esse período de transformações o leite é chamado de leite de transição (LT), variando de 5 a 7 dias.

Essa matéria prima pode ser conservada em acondicionamento anaeróbico em garrafas de plástico de politereftalato de etileno (PET), técnica conhecida como silagem de colostro (SAALFELD, 2008). Esse processo de armazenamento é simples, dependente de BALs, as quais são naturalmente presentes nessas secreções (SAALFELD, 2008; AZEVEDO; DUARTE, 2013).

Nem todas as garrafas utilizadas produzem leite com fermentação adequada. Fatores como dia da ordenha, acondicionamento de forma incorreta, temperatura e presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos como enterobactérias e fungos, podem comprometer a fermentação do LT levando a perda do material por fermentações indesejáveis e putrefação (AZEVEDO; DUARTE, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2014).

As perdas do LT proveniente de segunda ordenha após o parto acondicionado de forma anaeróbica apresentam taxa de descarte superior a 90% (GERASEEV *et al.*, 2011), enquanto garrafas fermentadas com LT do 3º ao 6º dia apresentam taxa de fermentação adequada superior a 95%, pois com o desenvolver da lactação o teor de lactose aumenta até alcançar a porcentagem referente ao leite, favorecendo o crescimento de BAL que produzem ácido láctico e conseqüentemente reduzem o pH do fermentado, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (AZEVEDO *et al.*, 2014).

De acordo com Saalfeld (2008), a faixa ideal de pH colostro fermentado é 3,55 a 4,39, essa faixa indica fermentação adequada, permitindo boa conservação do material com redução do crescimento de microrganismos indesejáveis. Para que o declínio do pH ocorra o mais rápido possível, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis, é essencial que no início da fermentação a concentração de BAL estejam em quantidades mais elevadas (contribuindo também para boa fermentação (FERREIRA, 2013).

*Lactobacillus* spp., são encontrados em LT fermentado contribuindo para sua fermentação, redução do pH e inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (SAALFELD *et al.*, 2013).

### 3.2 Bactérias ácido lácticas

Esse grupo de bactérias são Gram positivo e catalase negativa, capazes de degradar lactato, transformando-o em ácido láctico. Apresentam interesse tecnológico, pois promovem efeitos benéficos ao hospedeiro ao produzirem compostos químicos que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (PARTOVI *et al.*, 2015).

As BAL podem ser encontradas em alimentos ricos em nutrientes como leite, queijo, carne, bebidas e vegetais, podendo também ser isolados de solos, lagos e do trato gastrointestinal de humanos e animais (PARTOVI *et al.*, 2015). Elas podem apresentar forma de bastonetes e cocos não esporulados, anaeróbios, anaeróbios facultativos ou aeróbios (GUEDES NETO *et al.*, 2005).

Essas bactérias podem conservar alimentos por longos períodos, pois fermentam os açúcares do alimento e reduzem o pH, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (SAAFELD *et al.*, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2014).

Os microrganismos mais importantes do grupo de BAL são os *Lactobacillus* spp. que possuem ampla aplicação na indústria de alimentos e podem ser utilizadas como culturas “starts” em produtos derivados do leite. Esse gênero é representado por bastonetes não esporulados Gram positivo, catalase negativo, produzem gás na fermentação da glicose e não produzem H<sub>2</sub>S (BARROS, 2009).

As principais espécies de *Lactobacillus* spp. encontrados em produtos lácticos são *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. parabuchneri*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. sanfranciscensis* e *L. composti* (BARROS *et al.*, 2009; TORRES-MARAVILLA *et al.*, 2016; SERNA *et al.*, 2011; PARTOVI *et al.*, 2014; BOUCHARD *et al.*, 2015).

### 3.3 Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas

Bactérias ácido lácticas produzem vários metabólitos secundários que exibem atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos, álcool etílico, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e surfactantes (HOR; LIONG, 2014; OTERO; NADER-MACÍAS, 2009, WINKELSTRÖTER; TULINI; DE MARTINIS, 2015). Esses compostos podem agir sinergicamente para inibir ou eliminar microrganismos patogênicos (Hor;Liong, 2014) ou de forma isolada como as bacteriocinas, que são compostos antimicrobianos naturais que se assemelham a antibióticos (NAIDU *et al.*, 1999).

Segundo Serna, Valencia e Campos (2011) as BAL poderiam ser utilizadas no tratamento de mastite bovina. Esses autores verificaram ação antibacteriana de BAL contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Em teste de difusão em ágar, *Lactobacillus brevis* e *Weissella confusa* apresentaram halos de inibição igual a 11,5 e 31,5 mm, respectivamente, contra *S. agalactiae* e halos de 17,5 e 9,5 mm, respectivamente, contra *S. aureus*.

Em outro estudo, *Lactobacillus* spp. isolados de queijo coalho inibiram cepas de *Staphylococcus* spp. e *E. coli* CM2M17 isoladas da mesma amostra de queijo coalho (GUEDES NETO *et al.*, 2005).

*Enterococcus faecium* ET05, ET12 e ET88, *Lactobacillus curvatus* ET06, ET30 e ET35, *Lactobacillus fermentum* ET35, *Pediococcus acidilactici* ET34 e *Lactobacillus delbrueckii* ET32 isolados de salmão defumado inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes* após 24 horas de incubação. Os autores sugeriram que as bacteriocinas produzidas seriam microbicida para essa bactéria patogênica e que essas BAL poderiam ser utilizadas como forma de controle na contaminação de alimentos por esta estirpe (TODOROV *et al.*, 2011).

A atividade inibitória de *Lactobacillus acidophilus* La5 (cultura comercial probiótica liofilizada) foi testada contra *S. aureus* e *E. coli* provenientes de humanos, resultando em halos de inibição maiores que 14 mm contra essas duas bactérias patogênicas. Essa inibição poderia ter ocorrido devido à presença de ácido láctico e do baixo pH, pois a substância inibitória detectada é extracelular, difusível e apresentou comportamento ácido (Pereira; Gomez, 2007).

### 3.4 Bacteriocinas

Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos produzidas por bactérias que inibem o crescimento de outras cepas ou espécies bacterianas (MORELLI; VOGENSEN; WRIGHT, 2004). São codificadas em plasmídeos ou cromossomos, porém algumas são sintetizadas somente se os organismos alvos estiverem presentes (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas podem ser divididas em quatro classes (Tabela 1). As classes I e II são as principais classes de bacteriocinas devido a abundância e potencial de uso em aplicações comerciais (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004).

Tabela 1. Classificação de bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas

Classe	Descrição
Classe I	Lantibióticos
Classe II	Não-lantibióticos com pequena estabilidade ao calor IIa: Bacteriocinaspediocina com forte efeito contra <i>Listeria</i> IIb: Bacteriocinas de dois peptídeos IIc: Bacteriocinas de outros peptídeos
Classe III	Proteínas de grande sensibilidade ao calor
Classe IV	Bacteriocinas complexas: proteínas com lipídios e/ou carboidrato

Fonte: Adaptado de Nes *et al.*, 1996.



Estudo realizado por TODORIKI *et al.* (2001) relatou a primeira produção de bacteriocina por *Lactobacillus crispatus*, reportando atividade contra *Enterococcus faecalis*. Bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. isolados de iogurte têm apresentado atividade antimicrobiana contra patógenos como *Staphylococcus aureus* com halo de inibição mínimo de 13 mm e máximo de 18 mm (AHMED *et al.*, 2013).

As espécies *L. delbrueckii* e *L. fermentum* isoladas de colostro de búfalo apresentaram capacidade de produção de bacteriocina que inibiu *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus*. Essas substâncias mostraram amplo espectro de ação, em diferentes temperaturas e pH. Somente em temperatura de 80°C e pH 9 houve baixa atividade contra microrganismos Gram positivo e contra *E. aerogenes* e *B. subtilis*, respectivamente (VISWANATHAN *et al.*, 2015).

Sharma e Saharan (2014) relataram que bacteriocina produzida por *L. casei* MTL3, isolada de leite cru, mostraram atividade antimicrobiana significativa contra uma ampla gama de patógenos, incluindo *S. aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, e *Listeria innocua*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Agaliya e Jeevaratnam (2013) avaliaram a otimização de produção de bacteriocinas por cepas *Lactobacillus plantarum* JJ18 e *L. plantarum* subsp. *plantarum* JJ60, constatando máxima produção em caldo MRS, pH 6,4 a 37°C após 36 h, sendo necessária adição de glicose e tripton. Os autores relataram que as bacteriocinas permaneceram ativas mesmo com variações de pH de 4 a 7 e temperatura de 4 a 45°C. Uma nova bacteriocina produzida por *L. plantarum* 510, foi denominada plantaricin Y e apresentou forte atividade inibitória contra *L. monocytogenes* BCRC 14845 (CHEN *et al.*, 2014).

O efeito da administração da cepa selvagem *Lactobacillus salivarius* UCC118, conhecida por produção de bacteriocina classe IIb, na microbiota intestinal de ratos e suínos era avaliada por Riboulet-Bissonet *et al.* (2012). Os autores descreveram a possível produção de bacteriocina *in vivo*, uma vez que a administração de *L. salivarius* UCC118 diminuiu os níveis de espiroquetas em suínos e apresentou efeito inibitório sobre o gênero de *Firmicutes* em ratos e suínos. Os autores destacam o efeito inibitório sobre microrganismos Gram-negativo em ambos os modelos, mesmo a bacteriocina não tendo atividade *in vitro* contra esse grupo de microrganismo.

### **3.5 Sobrenadante de bactérias ácido lácticas no controle de biofilmes de *Staphylococcus* spp..**

O biofilme é uma matriz formada por bactérias e exopolissacarídeo, produzido pelas mesmas, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (COSTERTON, 1999). Por se localizarem na superfície, as células planctônicas são facilmente desprendidas do biofilme e carregadas pelo alimento aumentando a contaminação e podendo originar um novo biofilme. Os

exopolissarídeos contribuem na proteção das células sésseis e possibilita a entrada de nutrientes na matriz através de canais, favorecendo o crescimento e desenvolvimento do biofilme (MIZAN *et al.*, 2015). Além disso, o biofilme possui mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010), pois a matriz de polímeros extracelulares age como um adsorvente limitando a difusão de sanitizantes, podendo reagir e causar a inativação dos mesmos (Vidal; Ragot; Thibault, 1997). Alguns fatores como pH, temperatura, presença de nutrientes e má higienização de equipamentos favorecem a formação de biofilmes (VALDERRAMA; CUTTER, 2013).

Em diversas superfícies de ambiente alimentar pode ocorrer adesão e formação de biofilmes por *S. aureus*. Estudo realizado por Lee *et al.* (2014) indicou que quase 45% de *S. aureus* isolados de diferentes fontes em fazendas leiteiras produziram biofilmes em microplacas de polipropileno, aço inoxidável ou borracha.

Em outro estudo, o índice de formação de biofilme de *S. aureus* CCMB262 foi reduzido em 91% após o tratamento com o sobrenadante de *L. fermentum* TCUESC01 e em 80% na espessura do filme já formado (MELO *et al.*, 2016).

O sobrenadante de *L. bulgaricus*, *W. cibaria*, *L. fermentum* e *L. casei* inibiu significativamente o biofilme de *S. aureus*, efeito atribuído a ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, indicando que esses metabólitos agem sinergicamente na inibição de estirpes patogênicas (HOR; LION, 2014).

### **3.6 Staphylococcus spp. em bovinos**

A mastite reduz diretamente a produção e industrialização do leite, reduzindo a qualidade e quantidade do produto. Consiste na inflamação das glândulas mamárias, ocasionada por infecção bacteriana, podendo ser clínica ou subclínica (LOPES *et al.*, 2012).

A forma clínica da enfermidade apresenta sinais de edema de úbere, aumento da temperatura, endurecimento, grumos e pus. A forma subclínica apresenta aumento na contagem de células somáticas (CCS) do leite e diminuição do volume de leite podendo ser diagnosticada por métodos como *California Mastitis Test* (CMT) (FONSECA; SANTOS, 2000).

Os microrganismos com maior prevalência nos casos de mastite são *Staphylococcus* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 2011) pois são frequentemente encontrados na pele dos animais, ambiente e mãos de humanos. Fatores como falta de higiene nos locais de ordenha e mãos de ordenhadores contaminadas podem estar relacionados com a maior ocorrência de *Staphylococcus* spp. em casos de mastite clínica e subclínica (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, a frequente utilização de antibióticos favorece a seleção de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a diferentes grupos de antibacterianos (SAEKI *et al.*, 2011).

O tratamento de mastite a base de antibióticos químicos impede a comercialização do leite durante a administração do medicamento e por período posterior recomendado pelo

fabricante, pois resíduos destes fármacos são liberados pelo leite e afeta a sua qualidade (BRASIL, 2002).

Uma importante alternativa para controle de doenças em animais e redução da administração de antibióticos é o uso de produtos naturais, que pode contribuir principalmente para sistemas de produção orgânica e sustentáveis (MOREIRA *et al.*, 2014).

### 3.7 Resistência de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos

A resistência de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos na área da saúde humana e animal é um problema de saúde pública frequente relatado em diferentes continentes. Um dos fatores que favorece essa resistência é o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos (COSTA *et al.*, 2013).

Entre os principais causadores da mastite bovina, *Staphylococcus* spp. se destaca por ser frequentemente resistentes aos antimicrobianos, principalmente aos beta-lactâmicos (MENDONÇA *et al.*, 2012). A resistência é ocasionada pelo gene *MecA*, que está inserido no cromossomo por um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*) (MENDONÇA *et al.*, 2012). Esse gene é responsável pela resistência à meticilina em estirpes de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) que codifica as proteínas ligantes de penicilina de baixa afinidade, PBP2a ou PBP2', e pela produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, geralmente alocado em plasmídeos, podendo também ser cromossomal (LOWY, 2003).

Em 25 propriedades leiteiras situadas na região Sul Fluminense no Estado do Rio de Janeiro, foram isoladas 30 linhagens de *S. aureus* de amostra de leite ordenhado de vacas com mastite e dentre essas, 21 foram positivas para o gene *mecA* e 29 eram produtoras de beta-lactamases. Além disso, todos os isolados resistentes à oxacilina apresentaram o gene *mecA* (PRIBUL *et al.*, 2011). Em outra pesquisa realizada no Rio de Janeiro, Soares *et al.* (2012) detectaram o gene *blaZ* em 16% das estirpes de estafilococcus coagulase negativos isoladas de vacas com mastite e todos os isolados apresentavam o gene *mecA*.

Estudo realizado na região sul do estado de Minas Gerais indicou elevados índices de resistência para penicilina G, ampicilina e tetraciclina em *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite (COSTA *et al.*, 2013). De acordo com esses autores, esses elevados índices podem ser justificados pelo uso rotineiro desses antibióticos no tratamento de infecções intramamárias em vacas secas ou lactantes (COSTA *et al.*, 2013). Já no estado do Rio de Janeiro, Coelho *et al.* (2009) constaram resistência de 25% e 47% de *S. aureus* a oxacilina e penicilina respectivamente.

Algumas cepas de *S. aureus* apresentam multirresistência, como reportado por Pribul *et al.* (2011). Segundo esses pesquisadores, oito dos 30 isolados apresentaram resistência a no mínimo quatro antimicrobianos avaliados. Em outra pesquisa essa multiresistência foi também constatada indicando que 65,6% dos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de

casos de mastite nos Estados da Bahia e de Pernambuco apresentaram resistência simultânea a três ou mais antibacterianos (KREWER *et al.*, 2013).

A multirresistência dessa bactéria tem proporcionado casos com terapêuticas ineficientes e os grupos de antimicrobianos existentes são cada vez menos efetivos para o tratamento das infecções tornando-se necessárias novas abordagens terapêuticas e de prevenção no controle de *Staphylococcus* spp. Multirresistentes (MORITZ *et al.*, 2016).

### 3.8 Colibacilose

Uma das doenças mais frequentes em bezerros é a diarreia, que acomete os animais principalmente nas quatro primeiras semanas de vida (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014). Essa alteração é consequente de fatores como ambiente impróprio, animal mal manejado, incapacidade do sistema imunológico e nutrição inadequada.

*Escherichia coli* são bactérias Gram negativas, fermentadoras de lactose, anaeróbias facultativas e agente etiológico da colibacilose. São integrantes da microbiota intestinal dos bezerros. Porém, podem ser patogênicas, causando diarreia em animais recém nascido ao produzir enterotoxina. Essas cepas são agrupadas de acordo com os sinais clínicos que são relacionados com os fatores de virulência (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

Os grupos causadores de diarreia em bezerros são divididos em *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), caracterizados por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado, o íleo e por produzirem enterotoxinas que alteram as funções dos enterocitos, aumentando a secreção e reduzindo a absorção de líquidos. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) causa lesão “*attaching and effacin (A/E)*”, caracterizada pela adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades intestinais, além de alterações no citoesqueleto. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) produz toxinas Shiga e lesões A/E e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (FRANCK *et al.*, 1998).

A colibacilose também denominada diarreia neonatal em bovinos, é um quadro complexo que gera gastos com medicação e morte dos animais. A diarreia desencadeia prejuízos na pecuária bovina de corte e, além 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).

#### 4 REFERÊNCIAS

AGALIYA, P. J.; JEEVARATNAM, K. Characterisation of the bacteriocins produced by two probiotic *Lactobacillus* isolates from idlibatter. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1525-1535, 2013.

AHMED, M. M. *et al.* Bacteriocin profiling of probiotic *Lactobacillus* spp. isolated from yoghurt. **International Journal of Pharmaceutical Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 50-56, 2013.

AZEVEDO, R. A. *et al.* Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, p. 271-276, 2014.

AZEVEDO, R. A. *et al.* Desempenho de bezerros alimentados com silagem do leite de transição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 545-552, 2013.

AZEVEDO, R. A.; DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. **Revista Eletrônica de Pesquisa Animal**, v. 1, p. 84-98, 2013.

BARROS, M. R. *et al.* Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do inglúvio e cecos de aves sobre *Salmonella*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 863-868, 2009.

BOUCHARD, Damien S. *et al.* Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. **PLoS one**, v. 10, n. 12, p. 1-18, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa no 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 set. 2002. Seção 1. p.13.

CHEN, Y. *et al.* Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 3, p. 193-199, 2014.

COELHO, S. M. O. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 369-374, maio, 2009.

COSTA, G. M. et al. Resistência a antimicrobianos em *S. aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 80, n. 3, p. 297-302, jul.-set. 2013.

COSTERTON J.W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents** 1999; 11: 217–221. PMID: 1039497

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização<sup>1</sup>. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

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.

GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. supl. 2, p. 245-250, 2005.

HOR, Yan Yan; LIONG, Min Tze. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. **Dermatologica Sinica**, v. 32, n. 3, p. 141-147, 2014.

KREWER, C. C. et al. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.601-606, maio 2013.

LEE, S. H. I. et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1812-1816, 2014.

LOPES, M. A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 477-483, 2012.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *S. aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, May 2003

MACHADO NETO, R. *et al.* Avaliação do fornecimento adicional de colostro para bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 2, p. 420-425, 2004.

MELO, Tauá Alves *et al.* Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 250, 2016.

MIZAN, Md Furkanur Rahaman; JAHID, Iqbal Kabir; HA, Sang-Do. Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. **Food microbiology**, v. 49, p. 41-55, 2015.

MOREIRA, G. M. *et al.* Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino<sup>1</sup>. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 626-632, 2014.

MORELLI, L.; VOGENSEN, F. K.; WRIGHT, A. von. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3rd ed. Finland: Marcel Dekker, 2004. cap. 7. p. 249-294.

MORITZ, F.; MORITZ, C. M. F. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2016.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H.. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

OLIVEIRA, C. M. C. *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

OUWEHAND, A. C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3rd ed. Finland: Marcel Dekker, 2004. cap. 11. p. 375-396.

PARTOVI, R. *et al.* Microbiological and Chemical Properties of Siahmazgi Cheese, an Iranian Artisanal Cheese: Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 871-880, 2015.

PEREIRA, V. G; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 229-239, 2007.

PRIBUL, B. R. et al. Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp. em *S. aureus* isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 744748, jun. 2011.

RIBOULET-BISSON, E. et al. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.

SAALFELD, M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p.1636-1641, 2013.

SAALFELD M.H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terns leiteiras. **Hora da Veterinaria**, v. 162, p. 59-62, 2008.

SAEKI, E. K. et al. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 284-290, 2011.

SALVADORI, M. R. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 230-235, 2003.

SERNA, C. L.; VALENCIA, H. L. J.; CAMPOS, G. R. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. **Rev. Bio. Agro**, v. 9, n. 1, p. 97-104, 2011.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International journal of microbiology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

SOARES, L. C. et al. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 692- 696, ago. 2012.

TODORIKI, K. et al. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 154-159, 2001.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 166-172, 2007.



TODOROV, S. D. *et al.* Potential beneficial properties of bacteriocin- producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of applied microbiology**, v. 110, n. 4, p. 971-986, 2011.

TORRES-MARAVILLA, E. *et al.* Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 385-396, 2016.

VALDERRAMA, W. B.; CUTTER, C. N. An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 8, p. 801-817, 2013.

VIDAL, D. R.; RAGOT, C.; THIBAUT, F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. In: **Annales pharmaceutiques francaises**. 1996. p. 49-54.

VISWANATHAN, S. *et al.* Probiotic Studies in Colostrum of Buffalo. **Global Veterinaria**, v. 14, n .2, p. 199-204, 2015.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. New York: CRC Press, 2006. 782 p.

**4 Artigo I**

**Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes do leite de transição  
bovino fermentado**

(Elaborado conforme normas da revista: Interciência)

## SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PROVENIENTES DO LEITE DE TRANSIÇÃO BOVINO FERMENTADO

(Selection of lactic bacteria with probiotic potential from fermented bovine transition milk)

### RESUMO

O leite de transição de bovinos fermentado é rico em nutrientes e apresenta elevada população de bactérias ácido lácticas (BAL), contribuindo para sua conservação e inibição de crescimento de microrganismos patogênicos. Caracterizou-se a população de BAL no leite de transição fermentado em função do dia de coleta após o parto e selecionou-se *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico para bezerros e fermentativo para essa matéria prima. Para seleção desses microrganismos analisou-se a produção de catalase, Gram e aspectos morfológicos das colônias. Durante a fermentação, utilizando inóculos de estirpes selecionadas, 83% fermentaram adequadamente o leite de transição. Foram selecionados três morfotipos que apresentaram resistência aos sais biliares nas concentrações de 0,3, 0,5 e 1%, resistência ao ácido clorídrico e que apresentaram perfis bioquímicos compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*. Avaliou-se o antagonismo para três amostras de *Escherichia coli* provenientes de bezerro com diarreia, o qual foi verificado zonas de inibição para estirpe de *Lactobacillus brevis* (A1). Futuros estudos *in vivo* podem apontar esse isolado como aditivo microbiano para favorecer a fermentação do leite de transição, contribuindo para o armazenamento desse alimento, e para o controle de diarreias em bezerros.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus* spp.. Antagonismo bacteriano. Colibacilose em bezerros. Caracterização bioquímica.

### SUMMARY

Fermented bovine transition milk is rich in nutrients and has a high population of lactic acid bacteria (BAL), contributing to its conservation and inhibition of growth of pathogenic microorganisms. The BAL population in the fermented transition milk was characterized according to the day of collection after calving and *Lactobacillus* spp. With probiotic potential for calves and fermentative for this raw material. For the selection of these microorganisms the production of catalase, Gram and morphological aspects of the colonies were analyzed. During fermentation using inoculums of selected strains, 83% properly fermented the transition milk. Three morphotypes were selected that showed resistance to bile salts at concentrations of 0.3, 0.5 and 1%, resistance to hydrochloric acid and that presented biochemical profiles compatible with the species *Lactobacillus brevis*. The antagonism was evaluated for three *Escherichia coli* samples from calves with diarrhea which showed zones of inhibition for *Lactobacillus brevis* strain (A1).. Future *in vivo* studies may point to this isolate as a microbial additive to favor the transition milk fermentation, contributing to the storage of this food and to control diarrhea in calves.

Key words: *Lactobacillus* spp.. Bacterial antagonism. Colibacillosis in calves. Biochemical characterization.

#### RESUMEN

La vaca fermentado, leche de transición es rico en nutrientes y tiene una alta población de bacterias del ácido láctico (LAB), contribuyendo a su conservación e inhibición de crecimiento de microorganismos patógenos. Se caracteriza la población del LAB en transición leche fermentada debido al día de recolección después de su nacimiento y fue seleccionado *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico para los terneros y la fermentación de esta materia prima. Para la selección de estos microorganismos analizado la producción de catalasa, Gram y los aspectos morfológicos de las colonias. Durante la fermentación utilizando inóculos de cepas seleccionadas, el 83% fermentó adecuadamente la leche de transición. Se seleccionaron tres morfotipos que mostró resistencia a sales biliares en concentraciones de 0,3, 0,5 y 1%, la resistencia al ácido clorhídrico y perfiles bioquímicos mostró que el *Lactobacillus brevis* especies compatibles. Se evaluó el antagonismo con tres muestras de *Escherichia coli* a partir de terneros con diarrea, que se verificó zonas de inhibición para la cepa de *Lactobacillus brevis* (A1). Futuro en estudios in vivo puede señalar este aislado como aditivo microbiano para promover la transición de la fermentación de la leche, lo que contribuye al almacenamiento de que los alimentos y el control de la diarrea en los terneros.

Palabras clave: *Lactobacillus* spp.. Antagonismo bacteriano. Colibacillosis en terneros. Caracterización bioquímica.

#### INTRODUÇÃO

O colostro e o leite de transição excedente constituem numa importante alternativa para o aleitamento artificial de bezerros, em virtude dos elevados níveis proteicos e energéticos. Essa matéria prima pode ser conservada, sob acondicionamento anaeróbico, em garrafas de plástico de politereftalato de etileno (PET), técnica conhecida como silagem de colostro (Saalfeld, 2008). Esse processo de armazenamento é simples, dependente de bactérias lácticas, as quais estão naturalmente presentes nessas secreções (Saalfeld, 2008; Azevedo e Duarte, 2013). Nem todas as garrafas fermentadas produzem fermentação adequada. Fatores como dia da ordenha, acondicionamento de forma incorreta, temperatura e presença de microorganismos deteriorantes e patogênicos como enterobactérias, leveduras e mofos podem alterar de forma negativa na fermentação leite de transição (Azevedo e Duarte, 2013; Ferreira, 2013).

Geraseev *et al.* (2011) avaliaram silagem de colostro *in natura* e constataram perdas com taxa de descarte superior a 90% para colostro proveniente da segunda ordenha após o parto. Enquanto garrafas fermentadas com leite de transição do 3º ao 6º dia apresentaram taxa de fermentação adequada superior a 95%, pois com o desenvolver da lactação o teor de lactose aumenta até alcançar a porcentagem referente ao leite, favorecendo o crescimento de BAL que consomem o lactato com produção de ácido láctico e conseqüentemente reduzem do

pH do fermentado, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (Azevedo *et al.*, 2014). O leite de transição do quarto dia pode ser selecionado por ser um dia intermediário durante a transição de colostro para leite, pois o dia de coleta do material influencia diretamente na eficiência da fermentação para o armazenamento do colostro e do leite de transição de forma anaeróbica, garantindo melhor fermentação amostras coletadas a partir do segundo dia de lactação (Azevedo *et al.*, 2014). Além de ácido lático, BAL tem capacidade de produzir ácido acético, peróxido de hidrogênio e proteínas que também inibem o crescimento de bactérias patogênicas (Ferreira, 2013) como a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) causadora de colibacilose em bezerros.

A colibacilose é uma doença infectocontagiosa que acomete frequentemente animais mais jovens, nos primeiros dias de vida, desencadeando diarreia e frequentemente morte (Salvadori *et al.*, 2013). Para o tratamento e controle, são frequentemente administrados antibacterianos. No entanto, a toxicidade, alergias e o favorecimento à resistência têm fomentado o interesse por probióticos, como alternativa à antibioticoterapia (Duse *et al.*, 2015).

Um dos gêneros mais estudados de BAL são os *Lactobacillus* spp. que tem contribuído para melhorar o estado de saúde de bezerros recém-nascidos (Maldonado *et al.*, 2012; Bayatkouhsara *et al.*, 2013). Entretanto, poucos estudos têm avaliado e caracterizado a população de bactérias lácticas com potencial probiótico e naturalmente presentes em colostro ou leite de transição fermentado. A seleção de *Lactobacillus* spp. fermentativos para o leite de transição excedente poderia contribuir para o melhor armazenamento desse alimento e reduzir a população de bactérias patogênicas causadoras de diarreia em bezerros. Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar e selecionar bactérias lácticas com potencial probiótico e fermentativo provenientes do leite de transição bovino fermentado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Coleta do material*

O leite de transição utilizado foi obtido na ordenha mecânica de vacas Holandesas, entre o 3º e o 6º dia após o parto, criadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, Montes Claros, Norte de Minas Gerais. Após a coleta o leite de transição foi transferido para garrafas do tipo *pet* de dois litros para fermentação durante 141 dias conforme descrito por Azevedo e Duarte (2013). Para cada um dos quatro períodos após o parto, foram selecionadas quatro garrafas, correspondendo o total de 16 amostras com o leite fermentado, apresentando boa aparência, odor agradável e separação adequada do coágulo e da gordura conforme descrito por Saalfeld (2008).

### *Isolamento e seleção de bactérias ácido lácticas*

Para o cultivo microbiano, o material das garrafas foi homogeneizado e alíquotas de 1 mL foram diluídas em tubos contendo 9 mL de solução salina. Posteriormente, alíquotas de 0,1

mL foram inoculadas em placas de petri contendo os meios Agar MRS, Agar MacConkey, Agar Sabouraud Dextrose e Ágar Sal Manitol para determinação de bactérias ácido lácticas, enterobactérias, *Staphylococcus* spp, fungos e leveduras. As placas contendo meio MRS foram colocadas em jarras de anaerobiose e a incubação ocorreu em estufa BOD a 37°C por 48 horas e posteriormente realizou-se a contagem das colônias.

Entre as colônias de bactérias lácticas que cresceram no meio MRS foram selecionados morfotipos diferentes e conservados em duplicatas em tubos contendo BHI e glicerol a -4 °C. Foram realizadas análises morfo-tintorial das mesmas pelo método de Gram e a partir dessas mesmas colônias foram feitos teste de catalase (Bujnakova *et al.*, 2014).

Os dados de contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram transformados para  $\log_{10}$  e avaliados em função dos dias de lactação após o parto e de acordo com as morfologias predominantes. As médias de contagens bacterianas foram comparadas pelo teste de Duncan no pacote estatístico SAEG, considerando o nível de significância de 5%.

#### *Análise de pH e acidez*

Amostras de 10 mL foram coletadas de cada garrafa para aferição do pH com auxílio de um potenciômetro digital (DIGMED – DM20).

Posteriormente, a acidez titulável foi realizada conforme descrito pela Federation Internatinal de Laiterie (1991). Em um béquer de 50 mL foram adicionados 10 mL do leite de transição fermentado e 10 mL de água destilada. Posteriormente a amostra foi titulada com solução de NaOH 0,1N até o ponto de viragem. Os valores foram expressos em graus Dornic (°D).

#### *Perfil de fermentação de bactérias ácido lácticas*

Para verificar o perfil de fermentação do leite de transição e selecionar BAL fermentativas, coletou-se o leite de transição do quarto dia após o parto dos quartos mamários de uma vaca Holandesa, sem mastite. As amostras foram acondicionadas em erlenmeyer de 2L esterilizado. O inóculo foi preparado a partir de seis cepas de bactérias lácticas predominantes e selecionadas da etapa anterior que foram conservadas em caldo BHI. Foram duas cepas de cada um dos morfotipos observados anteriormente. Os tipos foram denominados de acordo com o morfotipo das colônias, A1 e A2 (pequena branca), B1 e B2 (pequena achatada) e C1 e C2 (grande branca).

Inoculou-se 2 mL do meio BHI contendo a cepa ativada das bactérias lácticas em tubos de ensaio de rosca contendo 18 mL do leite de transição do quarto dia, com concentração próxima a  $10^7$  UFC/mL. Após homogeneização o tubo foi vedado e incubado em estufa BOD a 37°C por 33 dias. Esse procedimento foi realizado com quatro repetições. Após a incubação, foram promovidas análises de odor, pH e acidez titulável.

Posteriormente a essas análises, as amostras A1, B1 e C1 foram selecionadas por apresentarem três fases distintas de fermentação, coágulos compactos e bem formados, odor característico, pH entre 4,31 e 4,52 e por representarem um morfotipo de cada.

#### *Caracterização bioquímica*

Para caracterização bioquímica dos três isolados selecionados (A1, B1 e C1), promoveu-se a análise em galerias API 50 CHL (BioMérieux SA, Marcy- l'Etoile/ França). Esse *kit* permite avaliar a capacidade de fermentação de 49 carboidratos e derivados. Para análise dos resultados, utilizou-se o programa de probabilidade LAB PLUS software version 4.0 database da BioMerieux, Marcy l'Etoile, France (Biomérieux, 2016).

#### *Resistência a sais biliares*

Resistência aos sais biliares foi verificada para os três morfotipos de bactérias lácticas selecionadas nas etapas anteriores, denominados A1 (pequena branca), B1(pequena achatada) e C1 (grande branca). Para o estudo de viabilidade às diferentes concentrações de sais biliares, foram inoculados 100 µL do inóculo em ágar MRS, contendo 0; 0,3; 0,5 e 1,0 % de sais biliares. 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 Noh e Gilliland (1993).

#### *Resistência a pH ácido*

Para avaliar a resistência ao ácido clorídrico, o pH do caldo BHI foi ajustado de 3,0 a 5,0 com adição de ácido clorídrico estéril PA e o pH 7,0 foi utilizado como controle. 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. Posteriormente 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 (Malveira *et al.*, 2016).

#### *Antagonismo*

O efeito antagonista dos isolados selecionados foi avaliado para três isolados de *Escherichia coli* como bactérias reveladoras, sendo uma cepa ATCC 25922 (E1). O segundo

isolado foi proveniente de fezes de bezerra holandesa com um mês de idade (E2) e o terceiro proveniente do intestino delgado de bezerro holandês 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 MacConkey 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). Foram também identificados pelo sequenciamento dos fragmentos 16 S e 23 S do DNA ribossomal (Reysenbach *et al.*, 2000; Chapaval *et al.*, 2008). A inibição do crescimento dessas bactérias patogênicas foi verificada com adaptação do método descrito por Tagg e 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, 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 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 (Chaves *et al.*, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Seleção de bactérias ácido lácticas*

Ao comparar a média de concentração de bactérias lácticas do terceiro ao sexto dia, verificou-se que não houve diferença significativa para esses períodos de coleta apresentando média de  $7,88 \times 10^5$  UFC/mL. Não houve crescimento de Bastonetes Gram-negativo, fungos filamentosos e leveduras para os quatro dias de coletas avaliados. Entretanto, a presença de *Staphylococcus* spp. somente não foi verificada para as amostras do sexto dia de coleta.

Saalfeld *et al.* (2013) em estudo de colostro fermentado anaerobicamente como alternativa para alimentação de bezerras, observaram que os microrganismos que se mantiveram viáveis até 360 dias foram bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. A presença de *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. e leveduras do gênero *Candida* spp. foi observado na silagem de colostro até 14 dias de fermentação. Entretanto, a partir de 21 dias foram isolados apenas bactérias do gênero *Lactobacillus* spp.. Esses resultados poderiam ser justificados uma vez que maioria das bactérias patogênicas não sobrevivem em condições ácidas (Hirsh, 2003). De acordo com Ferreira (2013) o desenvolvimento de BAL, enterobactérias e leveduras são influenciados diretamente pelo tempo de armazenamento com impacto direto no processo fermentativo. Nesse mesmo estudo o autor observou alta contagem de BAL ( $8,37 \log$  UFC/mL  $\pm 1,43$ ) após 56 dias de fermentação anaeróbica.

Foram verificados três morfotipos de bactérias lácticas considerando as características das colônias como colônias pequenas brancas (Lac A), colônias pequenas achatadas (Lac B) e



colônias grandes brancas (Lac C). Houve diferença significativa entre as concentrações dos três morfotipos de bactérias lácticas isoladas, com predomínio de colônias pequenas brancas (Lac A), seguido das colônias pequenas achatadas (Lac B) (Tabela 1).

Tabela 1- Concentração média de diferentes morfotipos de colônias de bactérias lácticas provenientes da silagem do leite de transição de acordo com o dia de coleta, após o parto de vacas Holandesas, expressas em log UFC/mL

Dias de coleta	Lac A	Lac B	Lac C
Terceiro	5,73±0,09	3,25±2,60	2,64±1,89
Quarto	5,68±0,26	4,35±2,26	2,96±2,26
Quinto	5,33±0,30	4,39±2,27	1,99±1,97
Sexto	5,17±1,65	3,66±2,20	2,69±2,03
Media geral	5,48±0,80 a	3,91±2,15b	2,57±1,86c

Letras minúsculas divergentes nas linhas indicam diferença significativa, estimada pelo teste de Duncan, com valores de  $P < 0,05$ .

Para os diferentes dias de coletas analisados, a média de pH foi 3,58 e da acidez titulável 34,8 °D do leite de transição, após a fermentação. O pH ácido esta diretamente ligado a seleção de bactérias lácticas, inibição de bactérias patogênicas e conservação do leite de transição fermentado. Neste estudo foi constatado alta concentração de BAL, inibição de bactérias patogênicas no sexto dia de fermentação e todas as garrafas selecionadas apresentavam boa fermentação.

Saalfeld *et al.* (2013) no colostro fermentado anaerobicamente, observou que os valores de pH diminuíram após sete dias de fermentação, acompanhada pelo aumento de percentagem de ácido láctico, cujos valores encontrados com 60 dias de fermentação foram 4,0 e 28,7°D de pH e ácido láctico, respectivamente. Já Ferreira (2013), constatou menores valores de pH (3,95) para colostro fermentado entre 14 e 21 dias. Na presente pesquisa as médias de pH foram menores o que poderia ser justificado pelo maior período de fermentação e armazenamento.

#### *Características fermentativas*

Neste estudo, 83% das estirpes selecionadas fermentaram adequadamente o leite de transição, indicando que a boa fermentação pode ser influenciada pelas estirpes de BAL. As características fermentativas do leite de transição incubado com os seis isolados durante 33

dias de fermentação diferiu entre as amostras utilizadas qualitativamente. O pH inicial do leite de transição utilizado para a fermentação foi de 6,4 e quatro isolados promoveram redução desse valor para valores  $\leq 4,4$ . Entretanto a amostra C2 apresentou aspecto aquoso, odor forte, pH acima de 5 e média de acidez igual 23,5°D (Tabela 2).

A fermentação inadequada dessa amostra, pode ter ocorrido devido a menor produção de ácido láctico. O odor pútrido pode estar diretamente relacionado a presença de fungos na amostra (Azevedo *et al.*, 2014). Em estudo realizado por Azevedo *et al.* (2014) foi observado que em amostras provenientes de garrafas com fermentações inadequadas, os cultivos indicaram positividade de 6,7% para Enterobacteriaceae, 33,3% para *Staphylococcus* spp. e 86,7% para fungos. A maior prevalência da população de fungos pode ser um dos fatores responsáveis pelo estufamento e odor pútrido característicos das amostras descartadas.

Entre os fatores relacionados às perdas no armazenamento por fermentação do colostro bovino, a produção de gases, odor pútrido, pH mais elevado, são características de fermentações inadequadas que inviabilizam a utilização desse produto (Azevedo *et al.*, 2014).

Tabela 2- Análise das características, aspecto, odor, coágulo (cm), pH e acidez do leite de transição inoculado e fermentado por seis isolados de *Lactobacillus*

<b>Cepas</b>	<b>Características do material fermentado</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Odor</b>	<b>Coágulo cm</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez (°D)</b>
<b>A1</b>	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a viscoso	Normal	8,25	4,4	36,0
<b>A2</b>	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a viscoso	Forte	9,38	4,3	33,0
<b>B1</b>	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a médio	Normal	11,53	4,5	27,5
<b>B2</b>	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Médio a viscoso	Normal a forte	10,48	4,3	37,25
<b>C1</b>	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a viscoso	Normal	10,73	4,4	34,0
<b>C2</b>	Nenhuma amostra apresentou boa fermentação	Aquoso	Forte a podre*	2,75	5,4	15,3

\*Odor forte ou podre: Odor característico de alimento em putrefação e presença de enxofre.

A boa fermentação é caracterizada pela formação de 3 fases distintas, coágulo bem formado, aspecto aquoso a viscoso e odor característico de silagem do leite de transição fermentado (Normal). De acordo com Saalfeld (2008), a faixa ideal de pH para fermentação adequada e conservação do colostro é de 3,55 a 4,39, nessa faixa de pH ocorre fermentação adequada, permitindo boa conservação do material com redução do crescimento de microrganismos indesejáveis. Para que o declínio do pH ocorra o mais rápido possível, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis, é essencial que no início da fermentação a concentração de BAL estejam em quantidades mais elevadas (Ferreira, 2013), contribuindo também para boa fermentação.

#### *Resistência a pH e a sais biliares*

As amostras selecionadas dos três morfotipos (A1, B1 e C1) resistiram às concentrações de 0,3, 0,5 e 1% de sais biliares, indicando que essas estirpes são capazes de suportar o pH ácido do estomago e os sais biliares de animais.

Todas as amostras apresentaram bom crescimento no pH 5 e 7 ou seja 75% (+++) e 100% (++++) de acordo com o padrão estabelecido. Para o pH 3 e 4 o morfotipo que apresentou melhor crescimento foi A1 (pequena branca), pois apresentou crescimento de 50% (++) no pH 3. A amostra C1 apresentou crescimento de 25% (+) no pH 3 e 50% (++) no pH 4 (Tabela 3).

Tabela 3- Resistência de isolados de três morfotipos de bactérias lácticas provenientes de colostro bovino fermentado em pH 3, 4, 5 e 7 e a sais biliares nas concentrações 0, 0,3, 0,5, e 1%

Morfotipos/Isolados	pH				Sal biliar			
	3	4	5	7	0 %	0,3%	0,5%	1%
A1*	++	++++	++++	++++	+	+	+	+
B1*	++	+++	++++	++++	+	+	+	+
C1*	+	++	+++	++++	+	+	+	+

\*A1(pequena branca) B1 (pequena achatada) e C1 (grande branca).

Nota: 100% (++++), 75% (+++), 50% (++) e 25% (+) para pH e + (uma cruz) indicando crescimento em sal biliar.

Estirpes de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* isolados de leite de camelo não pasteurizado fermentado durante uma semana em temperatura ambiente resistiram ao pH 3 durante um e duas horas de incubação ( Yateem *et al.*, 2008).

Em estudo avaliando potencial probiótico de *Lactobacillus* spp. de origem suína, observou que cinco isolados resistiram ao pH 3,0 até o tempo de 3h, indicando possivelmente viabilidade após a passagem pelo estômago do animal (Mangoni *et al.*, 2011).

Mangoni *et al.* (2011), ao avaliar o crescimento de *Lactobacillus* spp. provenientes de fezes de suínos e cultivados em meio acrescido com 0,3% de sais de bile, observaram que apenas duas cepas foram resistentes.

A sobrevivência ao pH ácido e a colonização no trato digestivo de microrganismos probióticos são aspectos críticos para o aumento da funcionalidade e a expressão de funções fisiológicas para promover à saúde aos animais (Meira *et al.*, 2010).

#### *Caracterização bioquímica*

A caracterização bioquímica indicou que os três isolados, apesar de apresentarem aspectos morfológicos diferentes de colônias, apresentaram perfil catabólico semelhantes, o que poderia ser justificado pela pressão seletiva durante o processo fermentativo do leite de transição bovino. Os três isolados avaliados apresentaram características compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*.

#### *Antagonismo*

Observou-se halo de inibição apenas para o isolado A1 (pequena branca), inibindo as cepas de E1 e E2. O halo médio encontrado foi de 12 mm para *E. coli* 1 e 15,4 mm para a *E. coli* 2.

Esse resultado constrata com aqueles reportados encontrados por Martins *et al.* (2006), que verificaram 10 de 12 isolados de BAL apresentando halo de inibição frente à *E. coli*, porém os diâmetros foram de apenas 5 a 13 mm. Chaves *et al.* (1999) ao analisarem isolados de *Lactobacillus acidophilus* usados como probiótico em bezerros constataram que quatro isolados apresentaram antagonismo frente à *E. coli* enteropatogênica.

Outro estudo realizado por Yateem *et al.* (2008), avaliando cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactococcus lactis lactis* isolados de leite de camelo não pasteurizado fermentado durante uma semana em temperatura ambiente, constataram zonas de inibições médias entre 15,7 a 23,7 mm frente a *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Escherichia coli* 8739, respectivamente.

Segundo Martins *et al.* (2006), o antagonismo observado pelos isolados pode ser devido à produção de ácidos, peróxido de hidrogênio ou bacteriocina, o que deve ser confirmado em futuros estudos para a cepa selecionada nesta presente pesquisa

## CONCLUSÃO

O leite de transição bovino com boa fermentação possui alta concentração de bactérias lácticas, pH ácido e baixa concentração de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Cinco das cepas selecionadas promovem boa fermentação ao leite de transição, indicando que a seleção de cepas pode contribuir na boa fermentação e conservação do leite de transição.

As cepas selecionadas que apresentaram características bioquímicas compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*, são resistentes a bile e pH ácido. Uma estirpe possui potencial inibitório frente a *E. coli* causadora de colibacilose em bezerros. Futuros estudos poderão indicar esse isolado selecionado como aditivo para fermentação do leite de transição e probiótico para bezerros.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e PRPq / UFMG

## REFERÊNCIAS

Azevedo RA, Guimarães F, Viegas CR, Almeida PNM, Gerasseev, LC, Pinto MS, Glória JR, Duarte ER (2014) Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 36, p. 271-276.

Azevedo RA, Duarte ER, Gerasseev LC, Coelho SG, Araújo L, Faria-Filho DE (2013) Desempenho de bezerros alimentados com silagem do leite de transição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, p. 545-552.

Azevedo RA, Duarte ER (2013) Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. *Revista Eletrônica de Pesquisa Animal*, v. 1, p. 84-98.

Bayatkouhsara J, Tahmasebib AM, Naserianb AA, Mokarramc RR, Valizadeh R (2013) Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*, v.186, p.1-11.

Bujnakova D, Strakova E; Kmet V (2014) In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of Lactobacilli isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, v. 29, p. 118-127. 2014.

Biomerieux Lab Plus. *Software version 4.0*. Disponível em: [apiweb.biomerieux.com](http://apiweb.biomerieux.com). Acessado dia: 30/09/2016.

Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM (2008) An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 60, p. 299-306.

Chaves, AH, Silva JFC, Pinheiro A (1999) Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 28, p.1086-92.

Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad E, Persson Y, Bengtsson B (2015) Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J. Dairy Science*, v. 98, p. 500-516.

Federation Internationale de Laiterie Yaourt: determination de l'acidité titrable (method potenciométrique). Bruxelles: Federation Internationale de Laiterie, 1991. 1p.

Ferreira, LS, (2011). *Silagem de colostro: caracterização do perfil de fermentação anaeróbia e desempenho de bezerros leiteiros* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Geraseev LC, Duarte DVL, Azevedo RA. et al. (2011). O pH da silagem de colostro bovino em função do dia de coleta. In: XXII Reunião Latinoamericana de Produção Animal, Montevideo, 24 a 26 de Outubro de 2011. Anais..., Montevideo – Uruguai,

Hirsh DC, Zee YC, *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. 446p.

Maldonado NC, Ruiz CS, Otero MC, Sema F, Nader-Macias ME (2012) Lactic acid bacteria isolated from young calves – Characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science*, v. 92 p. 342-349.

Malveira DS, Guimarães F, de Araujo VV, Duarte ER, Brandi IV, Pinto MS (2016) Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros nelore criados no semiárido. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.10, n.4, p.290-297.

Mangoni J, Pozza MSS, Sabedot MA, Pozza PC, Almeida S, Heinzen EL (2011) Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 33, n. 3, p. 267-272.

Martins ADO, Mendonça RCS, Silva DL, Ramos MS, Mauro MC, Donzele JL, Andrade NJ (2006) Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonica frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.5, n.1, p. 53-59.

Meira SMM, Helfer VE, Velho RV, Medina LFC, Brandelli A (2010) Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Braz. J. Food Technol*, v.3, p. 75-90.

Noh DO, Gilliland SE (1993) Influence of bile on celular integrity and b-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 1253-1259.

Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol*, v.66, p. 3798-3806.

Saalfeld MH (2008) Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de ternsiras leiteiras. *A Hora Veterinária*, v.162, p.59-62.

Saalfeld MH, Pereira DIB, Rodrigues KKS, Schramm R, Valente JSS, Borchardt JL, Gularte MA, Leite FPL (2013) Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciência Rural*, v.43, n.9, p.1636-1641.

Salvadori MR, Valadares GF, Leite DS, Blanco J, Yano T (2003) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz J Microbiol*, v. 34, p. 230-235.

Tagg JR, MC Given AR (1971) Assay sistem for bacteriocins. *Applied Microbiology*, v. 21, p. 943.

Yateem A, Balba MT, Al-Surrayai T, Al-Mutairi B, Al-Daher R (2008) Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci*, 3(4), 194-199.

#### 4 Artigo II

**Antagonismo e inibição de biofilmes de *Staphylococcus aureus* por sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. provenientes do leite de transição fermentado**

(Elaborado conforme normas do periodico: Journal Dairy of Science)



## RESUMO

O objetivo com este estudo foi avaliar o efeito inibitório de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas do leite de transição fermentado frente a *Staphylococcus aureus* proveniente de vaca com mastite aderidos em superfícies de aço inoxidável e borracha de teteira de ordenha mecânica de vacas. Entre os isolados de BAL avaliados foram identificados *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, e *Enterococcus* spp. Essas bactérias foram sensíveis a cinco antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite bovina e resistentes à oxacilina e vancomicina. Do total de quinze isolados de BAL, nove apresentaram zonas de inibição entre 12,53 e 25,83 mm frente a duas amostras de *S. aureus* em teste de difusão em ágar por sobrecamada. Adesão na borracha e biotransferência ao leite no aço não diferenciou estatisticamente entre as estirpes de *S. aureus* avaliadas. Foram evidenciadas menores concentrações de ambas as estirpes de *S. aureus* aderidas em cupons de aço inoxidável e borracha após 20 minutos de contato com os sobrenadantes de três BAL selecionadas, comparando-se com o controle. As eficácias de redução desses biofilmes variaram entre 12 a 15%. Esses resultados indicam que metabolitos produzidos pelas BAL selecionadas poderiam representar uma alternativa para redução ou formação de biofilme e contribuir para prevenção e controle de mastites em bovinos.

**Palavras chave:** MALDI-TOF, adesão microbiana, aço inoxidável, borracha de teteira, mastite bovina

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é o principal causador de mastite bovina (Reyher et al., 2011) e a prevenção e controle dessa doença é comprometida pela habilidade de se alojar profundamente nos tecidos da glândula mamária, reduzindo a produção de leite e aumentando os custos de produção (Saidi et al., 2013; Zafalon et al., 2008).

Essa bactéria apresenta frequentemente populações multi-resistentes a antimicrobianos (Sampimon et al 2011, Klimiene et al., 2011) e pode também ocasionar prejuízos na indústria de alimentos e na saúde pública, com a produção de toxinas termorresistentes envolvidas em intoxicação alimentar (Borges et al., 2008).

Outro agravante do controle de *S. aureus* é o potencial de formação de biofilmes maduros em diferentes superfícies utilizadas na produção de alimentos (Careli et al, 2009, Otto et al., 2012, Lee et al., 2014, Costa et al.,2016). Essas estruturas envolvem matriz de polímeros extracelulares unidas a aglomerados de bactérias aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (Costerton, 1999). Essa associação protege e favorece a resistência do microrganismo dentro do biofilme (Mizan; Jahid; Ha 2015). Quando não removidos das superfícies por procedimentos adequados de limpeza e desinfecção, esses microrganismos podem iniciar a contaminação, aderência e formação de novos biofilmes (Careli et al., 2009).

Há frequentes relatos de formação de biofilme em aço inoxidável, presentes em tanque de expansão e outros reservatórios da indústria leiteira (Lee et al., 2014). As borrachas de

teteiras de ordenha mecânica podem também favorecer a formação de biofilmes por apresentar curvas e porosidade para adesão microbiana e por ser o primeiro material a entrar em contato com o leite secretado (Amaral et al., 2004; Mafu et al., 1990). Uma pesquisa indicou que 45% de *S. aureus* isolados de diferentes fontes em fazendas leiteiras apresentaram a capacidade de produzir biofilmes em microplacas de polipropileno, aço inoxidável ou borracha, indicando a possível persistência desse patógeno no ambiente de ordenha e confirmando que cepas de *S. aureus* agentes de mastites poderiam aderir e formar biofilme em superfícies abióticas (Lee et al., 2014).

Alternativas de moléculas e agentes antimicrobianos para inibir a formação e reduzir ou eliminar biofilmes maduros tem sido frequentemente pesquisadas, e a utilização de bactérias ácido lácticas (BAL) e seus sobrenadantes de cultivos tem apresentado resultados promissores (Hor;Liong, 2014; Jaffar et al., 2016). Estudos indicam redução até 91% no índice de formação de biofilmes de *S. aureus* após tratamento com sobrenadante de *L. fermentum* e redução de 80% na espessura do biofilme já formado (Melo et al., 2016). Em nosso conhecimento a literatura científica não tem reportado produtos alternativos e naturais eficientes para inibir a formação ou reduzir biofilmes em borrachas utilizadas nas linhas de ordenhas de vacas leiteiras.

Os compostos antimicrobianos produzidos por BAL podem apresentar menor toxicidade comparada aos antimicrobianos convencionais, por serem compostos naturais produzidos durante o metabolismo celular. O leite de transição fermentado poderia representar uma fonte de BAL com potencial inibitório para bactérias patogênicas. Em leite de transição fermentado Saalfeld (2008) não observou o crescimento de bactérias patogênicas, isolando apenas BAL. O mesmo foi observado por Azevedo et al., (2014) para amostras fermentadas durante 18 meses, indicando que as BAL presente no leite de transição fermentado poderia produzir substâncias capazes de inibir o crescimento de patógenos.

Isolados de BAL provenientes do leite de transição fermentado poderiam produzir metabolitos eficientes para prevenir o crescimento e permanência de bactérias patogênicas na cadeia produtiva do leite. Dessa forma, o objetivo com este estudo foi avaliar o efeito inibitório de BAL isoladas do leite de transição fermentado frente a *Staphylococcus aureus* aderidos em superfícies de aço inoxidável ou borracha de teteira utilizada em ordenha mecânica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Isolamento de bactérias lácticas***

As bactérias ácido lácticas (BAL) foram isoladas do leite de transição do 4º dia após o parto de três vacas Girolando do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. O leite foi coletado e transferido para garrafas plásticas tipo PET com capacidade de 250 mL, sendo totalmente preenchidas e vedadas conforme descrições de Saalfeld (2008). Essas garrafas foram incubadas a 37°C durante 33 dias em estufa BOD para fermentação. Após esse período, foram homogeneizadas e retirou-se uma alíquota de 1000 µL e realizou-se diluições decimais em

solução salina estéril a 0,85%. Posteriormente, 100 µL das diluições foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar MRS (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e espalhada com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 48h em estufa BOD em aerobiose. Após esse período foi realizada coloração de Gram e teste de catalase das colônias com morfotipos diferentes crescidas. As cepas Gram positivas, catalase negativa e com forma de bastonetes foram selecionadas e criopreservadas em eppendorf contendo 1mL de BHI (*Brain Heart Infusion*) (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e 200 µL de glicerol.

### **Identificação das bactérias lácticas**

As BAL foram identificadas pela análise proteômica seguindo o protocolo de extração padrão adaptado de Freiwad e Saul (2009). Uma alçada de cultura bacteriana pura foi ressuspendida em 1,2 mL de solução de etanol 75%. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi removido. Ao *pellet* formado, foi adicionado 50 microlitros de acetronitrila, ácido fórmico e água (50:35:15 v/v) e agitou em vortex durante 1 min para lise das células. Foi realizada uma segunda centrifugação e 0,3 µL de sobrenadante foi depositado em uma placa com três poços e este foi seco em temperatura ambiente. Adicionou-se 0,3 µL de uma solução de saturada de alpha-ciano-4-ácido-hidroxicianídrico, acetronitrila, água e TFA (50:47:5:2,5 v/v).

A análise por *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy* (MALDI-TOF MS) foi realizada segundo Dusková et al (2012), utilizando Microflex TM MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). As identificações foram expressos por BioTyper log (*scores*), indicando a similaridade da cepa desconhecida por MALDI TOF MS com o perfil disponível em bancos de dados.

### **Sensibilidade de bactérias lácticas a antimicrobianos**

O antibiograma foi realizado em duplicata de acordo com o método de susceptibilidade a antimicrobianos proposto por Charteris et al., (1998). As BAL foram ativadas primeiramente em tubos contendo caldo MRS (*Difco*) e posteriormente em placas de Petri contendo ágar MRS (*Difco*) e incubadas a 37°C por 48h em estufa BOD. Com o auxílio de uma alça de platina, colônias de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio rosca contendo 3,5 mL de solução salina 0,85%, para se atingir a concentração aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL a qual correspondeu ao padrão 0,5 da escala *Mc Farland*. Foram adicionados 200 µL do inóculo que foram espalhados com auxílio de *swabs* estéreis na superfície de placas de Petri de 140x15mm contendo o agar MRS. Esse meio de cultura foi utilizado uma vez que as BAL não desenvolveram bem no agar Muller-Hinton. Foram utilizados discos de clindamicina - CLI (2 µg), ciprofloxacina - CIP (5 µg), eritromicina - ERI (15 µg), gentamicina - GEN (10 µg), oxacilina - OXA (1 µg), penicilina - PEN (10 UI), tetraciclina - TET (30µg) e vancomicina - VAN (30 µg). Esses discos foram alocados equidistantemente sobre meio de cultura e foram escolhidos por corresponderam aos princípios antibacterianos utilizados no controle de mastite bovina.

### **Bactérias patogênicas avaliadas**

Foram utilizadas duas estirpes *Staphylococcus aureus*, a cepa de referência ATCC 25923 (resistente a penicilina, clindamicina, oxacilina e vancomicina) e um isolado de vaca com mastite (SA 178) no Norte de Minas Gerais, Brasil, que foi resistentes a esses antibióticos e também a tetraciclina e eritromicina (Ribeiro et al. 2017). As bactérias foram criopreservadas como reportado anteriormente para as bactérias ácido lácticas.

### **Efeito antagonista de bactérias lácticas selecionadas contra *Staphylococcus spp.***

Os efeitos antagonistas de 15 isolados de BAL foram avaliados contra duas estirpes de *S. aureus*. O experimento foi realizado em três repetições, com duas duplicatas para cada amostra, conforme a técnica de sobrecamada adaptada relatada por Tagg, Dajami e Wannamaker (1976). No centro de uma placa de Petri (90 x 15mm) contendo 10 mL de agar MRS (*Difco*) foi inoculado uma gota de 5 µL de BAL crescidas em caldo MRS (*Difco*) de segunda ativação ( $10^8$  UFC/mL). As placas foram incubadas em estufa BOD a 37°C por 48h e posteriormente foram expostas a clorofórmio durante 30 minutos, dentro de fluxo laminar sob luz ultravioleta.

As bactérias reveladoras (SPATTCC E SP 178) foram ativadas duas vezes em caldo BHI (*Difco*) e 100 µL do cultivo ( $10^8$  UFC/mL) foram adicionados em tubos contendo 35 mL de ágar Muller-Hinton (*Difco*) semi-sólido a temperatura de aproximadamente 50°C. Esse meio de cultura inoculado foi vertido nas placas contendo as BAL crescidas e inativadas pelo clorofórmio. Após solidificação as placas foram incubadas a 37°C por 24h e os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados com o paquímetro digital. O delineamento experimental foi um fatorial 2x15 e após testes de normalidade e homogeneidade, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan com 5% de significância.

### **Inibição de biofilmes de *Staphylococcus aureus***

Para o preparo dos sobrenadantes de *Lactobacillus*, foram selecionadas três espécies de *Lactobacillus spp.* que apresentaram maiores médias de halos de inibição na etapa anterior. As BAL foram ativadas duas vezes em 10 mL de caldo MRS (*Difco*) e em seguida 4 mL de cada ativação foi inoculado em 35 mL desse mesmo meio de cultura. Os tubos foram então incubados em estufa BOD durante 72h á 37°C. Posteriormente o meio fermentado foi centrifugado a 1100 g durante 15 minutos e 10 mL do sobrenadante foi transferido para tubos falcons e utilizado nas análises.

### **Adesão e potencial de biotransferência de *Staphylococcus aureus***

Avaliou-se inicialmente a adesão das estirpes de *S. aureus* em cupons de aço inoxidável (AISI 304 #4), utilizado na indústria de alimentos e borracha de teteira (4212), utilizada na ordenha mecânica de vacas. Esses materiais tinham 2,0 cm x 2,0 cm x 0,1 cm e suas superfícies foram higienizadas e esterilizadas de acordo com Rossoni e Gaylarde (2000).

Para a formação de biofilmes, 1 mL de cada estirpe de *S. aureus* a 5 log UFC/mL, ativados como reportando anteriormente, foi inoculado em potes de vidro estéreis contendo 99 mL de leite UHT desnatado esterilizado e sete cupons de cada tipo de cupom. Esse sistema experimental foi mantido sob agitação constante em mesa agitadora orbital a 60 rpm a 28 °C durante 24 horas. Posteriormente, os cupons foram rinsados com água destilada e transferidos para uma nova amostra de leite desnatado esterilizado sem inoculação. Esse novo sistema foi mantido sob agitação de 60 rpm por mais 24 h, totalizando 48 h de adesão bacteriana. Esse período foi dimensionado com base na legislação vigente para qualidade do leite cru, que estabelece esse tempo máximo entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento onde será processado (Brasil, 2011).

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2 (isolados bacterianos; cupons), em quatro repetições. Após testes de normalidade e homogeneidade as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Para quantificação das células de *S. aureus* aderidas, um cupom de cada tipo foi retirado dos potes contendo leite, rinsados por 1 minuto em 10 mL de solução salina a 0,85% para retirada de células planctônicas, transferidos para 10 mL de solução salina a 0,85% e submetidos a banho ultrassônico por 2 minutos para desprendimento de células sésseis (Meireles et al., 2010). Realizaram-se diluições decimais, com plaqueamento em Ágar Sal Manitol e posterior incubação a 35°C±2°C por 24 h para quantificação das UFC/cm<sup>2</sup>.

Para avaliação do potencial de biotransferência das células aderidas aos cupons para o leite desnatado, utilizou-se a metodologia descrita por Boari et al., (2009) com adaptações. Alíquotas de 1000 µL foram retiradas e submetidas a diluições decimais seriadas, seguidas de plaqueamento em Ágar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 35°C±2°C por 24 h e após esse período realizou-se a contagem de UFC/mL de leite.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2 (isolados bacterianos; cupons), em quatro repetições. Após testes de normalidade e homogeneidade as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

#### ***Sensibilidade de biofilmes de Staphylococcus spp aos sobrenadantes de Lactobacillus***

Para testar a sensibilidade das células aderidas frente aos sobrenadantes de *Lactobacillus* spp., os cupons foram submetidos à rinsagem em 10 mL de solução salina a 0,85% estéril para remover as células planctônicas. Em seguida, foram transferidos para a solução sanitizante a ser avaliada, contendo 10 mL de sobrenadante das BAL. Para o controle, esses cupons foram submersos em 10 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Os tempos de contato dos cupons aderidos com os sobrenadantes e solução controle foram de 10 e 20 minutos. Para a quantificação das células bacterianas após o contato com os sobrenadantes, foram realizados os procedimentos para a retirada de células aderidas, descritos por Careli et al. (2009). Após diluições decimais, 100 µL foram inoculados em Ágar Sal Manitol e incubou-se a 35°C por 48 h. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup> e para o cálculo da eficiência de

redução dos biofilmes, utilizou-se a fórmula  $Eficácia\% = 100 [1 - (\log \text{ de ufc/cm}^2 \text{ do tratamento} / \log \text{ de ufc/cm}^2 \text{ do controle})]$ .

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3 x 2 x 2 x 2 (sobrenadantes; tempos; isolados bacterianos, cupons), em quatro repetições. Após testes de normalidade e homogeneidade as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Identificação de bactérias lácticas e sensibilidade a antimicrobianos**

A análise proteômica por MALDI TOF revelou que cinco isolados de BAL foram identificados como *Lactobacillus paracasei*, três como *Lactobacillus rhamnosus*, um como *Lactobacillus casei* e três como *Enterococcus* spp. (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de bactérias ácido lácticas isoladas do leite de transição fermentado identificadas pela técnica de Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF MS)

Amostra	Espécie	Valor (escore)*
LA2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,059
LA4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,043
LA15	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,124
LA6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,414
LA20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,368
LA11	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,39
LA17	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2,142
LA16	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1,954
LA 12	<i>Lactobacillus casei</i>	1,892
LA13	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,228
LA14	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,235
LA3	<i>Enterococcus faecium</i>	2,388
LA1	Não identificada	
LA7	Não identificada	
LA21	Não identificada	

\* Escore > 1,7 é indicativo de identificação de gênero e escore > 2,0 é o limiar definitivo para uma identificação de gênero e espécie.

Os 15 isolados de BAL avaliados apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina e tetraciclina e resistência à oxacilina. Somente quatro isolados (26,7%) de BAL foram sensíveis a vancomicina e moderadamente sensíveis a penicilina (Tabela 2).

Tabela 2- Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias ácido lácticas isoladas do leite de transição bovino fermentado

Bactérias	Antimicrobianos							
	CIP	CLI	ERI	GEN	OXA	PEN	TET	VAN
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA2	S	S	S	S	R	MS	S	S
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA4	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA15	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA6	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA20	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA11	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA17	S	S	S	S	R	MS	S	R
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA16	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>Lactobacillus casei</i> LA12	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Enterococcus faecalis</i> LA13	S	S	S	S	R	MS	S	R
<i>Enterococcus faecalis</i> LA14	S	S	S	S	R	R	S	S
Não identificada LA1	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Enterococcus faecium</i> LA3	S	S	S	S	R	S	S	R
Não identificada LA7	S	S	S	S	R	MS	S	R
Não identificada LA21	S	S	S	S	R	S	S	R

Legenda: CIP (ciprofloxacina, 5 µg), CLI (clindamicina, 2 µg), ERI (eritromicina, 15 µg), GEN (gentamicina, 10 µg), OXA (oxacilina, 1µg), PEN (penicilina, 10 UI), TET (tetraciclina, 30 µg), VAN (vancomicina, 30 µg). R = resistente, S = sensível, MS = moderadamente sensível.

A resistência aos β- lactâmicos pode ser explicada pela possível impermeabilidade da parede celular das bactérias ou pela produção e ação de β-lactamases (Charteris et al., 1998). Esses antibacterianos são os mais utilizados no tratamento de mastite, por isso é importante determinar se os genes que conferem resistência estão presentes nas BAL e se poderiam ser transferidos para outras bactérias.

Estudo com 12 amostras de BAL isoladas de queijo-de-minas artesanal realizado por Costa et al., (2013), apresentou resultados semelhantes aos verificados neste estudo. Os autores constataram que 100% das amostras testadas foram sensíveis à clindamicina, eritromicina e tetraciclina e resistentes a vancomicina e oxacilina e outras seis espécies de BAL foram classificadas como moderadamente sensíveis a penicilina dentre essas *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum* também identificadas nesta pesquisa.

A resistência à vancomicina e oxacilina observadas nos isolados de BAL, avaliados neste estudo, é esperada, uma vez que, estudos relatam que *Lactobacillus* spp. apresentam

resistência intrínseca a esse antimicrobiano (Zhou, 2005). A resistência natural a vancomicina deve-se à presença de enzimas relacionadas à d-alanina: d-ligase (Danielsen ;Wind, 2003).

Temmerman *et al.* (2002) observaram amostras de BAL isoladas de 55 produtos probióticos europeus que foram resistentes à penicilina. Estudo realizado por Zhou (2005) demonstrou que BALs foram também sensíveis à eritromicina e tetraciclina. Belletti *et al.* (2009) observaram resultados próximos ao presente trabalho, alta porcentagem de BAL resistentes a oxacilina e sensíveis à eritromicina e tetraciclina.

### **Efeito antagonista dos isolados de bactérias ácido lácticas contra *Staphylococcus aureus***

Neste estudo constatou-se efeito das estirpes de *Staphylococcus aureus*, ( $p < 0,0001$ ), dos tipos de BAL ( $p < 0,0001$ ) e da interação entre as bactérias lácticas e os *S. aureus* avaliados ( $p < 0,05$ ) sobre as médias dos diâmetros das zonas de inibição.

O efeito antagônico frente às duas cepas de *S. aureus* foi constatado para nove estirpes de *Lactobacillus* spp. (Tabela 3). As médias das zonas de inibição de *S. aureus* promovidas pelos *Lactobacillus* spp. LA16, LA2, LA12 e LA4 foram superiores aquelas observadas para as demais BAL (Tabela 3,  $P < 0,05$ ).

Os halos de inibição para ATCC 25923 foram significativamente maiores comparados aqueles observados para SA 178 ( $p < 0,0001$ ). Apenas para as cepas de *L. paracasei* (LA16 e LA11) e *L. casei* (LA12) essa diferença não foi observada.

As estirpes que promoveram maior halo de inibição foram *L. rhamnosus* LA2 (25,83 mm) para cepa ATCC 25923 e *L. paracasei* LA16 (22,93 mm) para SA 178 ( $p < 0,001$ ). Todos os halos de inibição foram significativamente diferentes para todas as amostras de BAL.

Tabela 3. Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo *in vitro* de bactérias ácido lácticas provenientes do leite de transição fermentado contra *Staphylococcus aureus* (SA 178) e cepa padrão (SA ATCC 25923)

Microrganismo	SA ATCC 25923	SA 178
<i>Lactobacillus casei</i> LA12	24,33 Ac	20,82 Ab
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA2	25,83 Aa	19,53 Bc
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA4	24,68 Ab	16,65 Bd
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA15	22,48 Af	12,93 Bh
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA16	23,13 Ae	22,93Aa
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA11	19,52 Ah	15,87 Af
<i>Enterococcus faecalis</i> LA13	23,38 Ad	13,57Bg
<i>Enterococcus faecalis</i> LA3	17,75 Ai	12,53 Bi
Não identificado LA17	21,95 Ag	15,48 Be

Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tipos de *S. aureus* avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre as bactérias ácido lácticas



avaliadas, considerando o teste de Ducan a 5% de significância. Coeficiente de variação = 18,10%.

O antagonismo pode ser efetuado pela competição por nutrientes, território e pela produção de substâncias antimicrobianas. As BAL podem produzir bacteriocinas ou outras substâncias antimicrobianas para favorecer competição, inibir ou mesmo excluir microrganismos patogênicos (Costa, 2010).

Uma das formas de ação dos compostos liberados por *Lactobacillus* spp. é de penetrar a parede celular da bactéria patogênica. Dessa forma, estudos com bactérias lácticas provenientes de diversas fontes tem mostrado o potencial inibitório contra bactérias patogênicas, principalmente bactérias causadoras de mastite bovina (Pribul et al., 2011; Piccart et al., 2016).

Neste estudo, as zonas de inibição de *S. aureus* ATCC 25923 foram em média 22,56 mm e foram semelhantes àquelas reportadas encontradas por Piccart et al. (2016) e Costa et al. (2013) que avaliaram BAL isoladas de mel de abelhas e queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG respectivamente.

Pribul et al. (2011), observaram que *Lactobacillus fermentum*, *L. casei* *susbp. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, produtoras de bacteriocinas, inibiram 30 estirpes de *S. aureus* provenientes de vacas com mastite, pela técnica de estrias cruzadas, indicando sensibilidade de pelo menos uma estirpe de *S. aureus* a cada *Lactobacillus* spp.. Piccart et al. (2016), também observaram o efeito inibitório *in vitro* de mistura de 13 espécies de BAL isoladas de mel de abelhas e adicionadas em mel de urze (planta) sueco através da técnica de sobrecamada, frente a 27 cepas de *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* provenientes de vacas com mastite, constatando efeito antimicrobiano com zonas de inibição entre 24 e 38 mm para *S. aureus*.

Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos minas artesanal da Serra da Canastra também evidenciaram efeito antagônico contra uma estirpe de *S. aureus*, apresentando zonas de inibição entre 23,01 e 49,99 mm (Costa et al., 2013; Andrade et al., 2014).

Nesta pesquisa o isolado SA 178 apresentou halos de inibição menores que aqueles observados para a ATCC 25923 (isolado clínico humano) evidenciando variações intra específicas para essas estirpes de *S. aureus*, que poderia estar relacionada às composição das paredes celulares ou presença de plasmídeos e genes que contribuiriam com essa suscetibilidade. Em outra pesquisa, o efeito antagônico de três sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de cepas de *Lactobacillus* spp. foi avaliado pelo método de difusão em ágar. Foram observados halos de inibição entre 5 e 10 mm para cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica e uma cepa de *Listeria monocytogenes*. Entretanto, não foi constatada inibição para estirpes de *S. aureus* e outras duas cepas de *Listeria monocytogenes* (Aoudia et al., 2016), indicando também variações inter específicas.

### **Adesão e potencial de biotransferência das cepas avaliadas**

A contagem de bactérias aderidas a superfícies da borracha e aço foi estatisticamente semelhante para SA178 e ATCC 6,57 UFC/cm<sup>2</sup>, apresentando média de 6,37 ± 0,55 UFC/cm<sup>2</sup> e 6,78 ± 0,76 log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente para os cupons.

Quanto ao potencial de biotransferência para o leite desnatado, não foram evidenciados efeitos do tipo de estirpe de *S. aureus* e do material dos cupons utilizados na formação dos biofilmes (P>0,05). As estirpes de *S. aureus* cresceram até 3 ciclos logarítmicos, após 48h de contato com o leite, obtendo-se concentração média de 8,39 ± 0,61 log UFC/mL de *S. aureus* após o tempo de 48 horas de adesão bacteriana para ambos os cupons

Segundo Andrade et al., (1998), a formação de biofilme maduro ocorre a partir de 7 log UFC/ cm<sup>2</sup> enquanto Ronner e Wong (1993) consideram a partir de 5 log UFC/ cm<sup>2</sup>. Dessa forma os resultados deste estudo indicaram a contagem média de *S. aureus* entre 6 e 7 log UFC/ cm<sup>2</sup>, conferindo-lhe a denominação de biofilme maduro para ambas as estirpes e materiais avaliados.

Em outro estudo foram detectadas diferenças de aderência de cepas padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 entre aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, constatando maior contagem de células viáveis em biofilmes para *P. aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium* com média de 7,13 log UFC/cm<sup>2</sup> e contagens inferiores para *L. monocytogenes* e *S. aureus* com média de 4,72 log UFC/cm<sup>2</sup> em ambos os cupons (Costa et al. 2016).

Em nosso conhecimento, na literatura científica ainda não existem dados de adesão bacteriana e biotransferência de patógenos em cupons de borrachas de teteiras. A inibição da formação de biofilme em teteiras é de grande relevância, pois esse material é o primeiro a entrar em contato com o leite secretado. Além disso, a mesma teteira é utilizada em outros animais no momento da ordenha, aumentando à transmissão de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Dessa forma ao inibir o crescimento e manutenção de bactérias causadoras de mastite, como *S. aureus*, favoreceria a obtenção de leite com melhor qualidade nas próximas etapas de processamento dos produtos láteos.

Essa redução inicial da contaminação bacteriana é fundamental para a saúde pública, visto que *S. aureus* em concentração superior a 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> UFC/g de alimento liberam toxinas em quantidade que podem causar intoxicação alimentar que se agrava principalmente em crianças e idosos (Borges et al., 2008)

### **Sensibilidade de biofilmes de *Staphylococcus* spp. aos sobrenadantes de *Lactobacillus* spp.**

Foi verificada menor concentração de ambas as estirpes de *S. aureus* aderidas em cupons de aço inoxidável e borracha após período de 20 minutos de contato com os sobrenadantes de ambas BAL avaliadas comparadas ao controle (Tabela 4, p<0,001). A

interação entre os tratamentos avaliados e os tipos de cupons foi significativa para o tempo de contato de 10 minutos ( $p < 0,001$ ). Para o tempo de contato de 20 minutos foi constatada interação dos tratamentos com os tipos de cupons (Tabela 4,  $p < 0,001$ ).

Neste estudo não foi evidenciado efeitos da estirpe de *S. aureus* e dos tempos de contato na contagem bacteriana após os tratamentos avaliados ( $P > 0,05$ ). As concentrações dessas bactérias foram significativamente maiores nos cupons constituídos por borracha de teteira em relação ao aço inoxidável ( $p < 0,05$ ), com exceção do tratamento durante 10 minutos com o sobrenadante da BAL *Lactobacillus rhamnosus* (LA2) para a ATCC 25923 (Tabela 4).

Tabela 4- Concentração de *Staphylococcus aureus* aderidos em cupons de aço e borracha de teteiras após o contato de 10 e 20 minutos com o sobrenadante de três estirpes de *Lactobacillus* spp. isolados do leite de transição fermentado

<i>S. aureus</i>	Controle	LA2	LA12	LA16
<i>Aço inoxidável em 10 minutos de contato</i>				
ATCC25923.	5,88±0,17 Ba	5,82±0,27Aa	5,50±0,37Bc	5,52±0,68Bb
SA178	5,26± 0,22Bb	5,71±0,25Aa	5,17± 0,54Bc	5,73±0,51Ba
<i>Borracha de teteiras em 10 minutos de contato</i>				
ATCC 25923.	6,81±0,34Aa	5,81±0,26Ab	5,77±0,68Ab	5,96±0,28Ab
SA178	6,86±0,83Aa	6,02± 0,64Ab	5,49±0,45Ab	5,56±0,35Ab
<i>Aço inoxidável em 20 minutos de contato</i>				
ATCC 25923.	6,11±0,78 Aa	5,41± 0,40 Bb	5,42± 0,53 Bb	5,51±0,80 Bb
SA178	6,64±0,87 Aa	5,80±0,33 Bb	5,52±0,55 Bb	5,30± 0,69 Bb
<i>Borracha de teteiras em 20 minutos de contato</i>				
ATCC 25923.	6,90± 0,91 Aa	5,82± 0,35 Ab	5,87± 0,56 Ab	5,84±0,07 Ab
SA178	6,76± 0,49 Aa	6,11±0,64 Ab	5,77± 1,20 Ab	5,78± 0,35 Ab

Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tipos de cupons avaliados. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos avaliados, considerando o teste de Scott-Knott a 5% de significância. Diferença mínima estatística = 0,22

#### **Eficácia de redução dos biofilmes de *Staphylococcus aureus***

Ao avaliar as eficácias de redução celular dos biofilmes de ambas as estirpes de *S. aureus* constatou-se efeitos dos cupons ( $p < 0,0001$ ), dos períodos de contato ( $p < 0,01$ ) e da interação entre períodos e tipos de cupons (Figura 1,  $p < 0,001$ ).

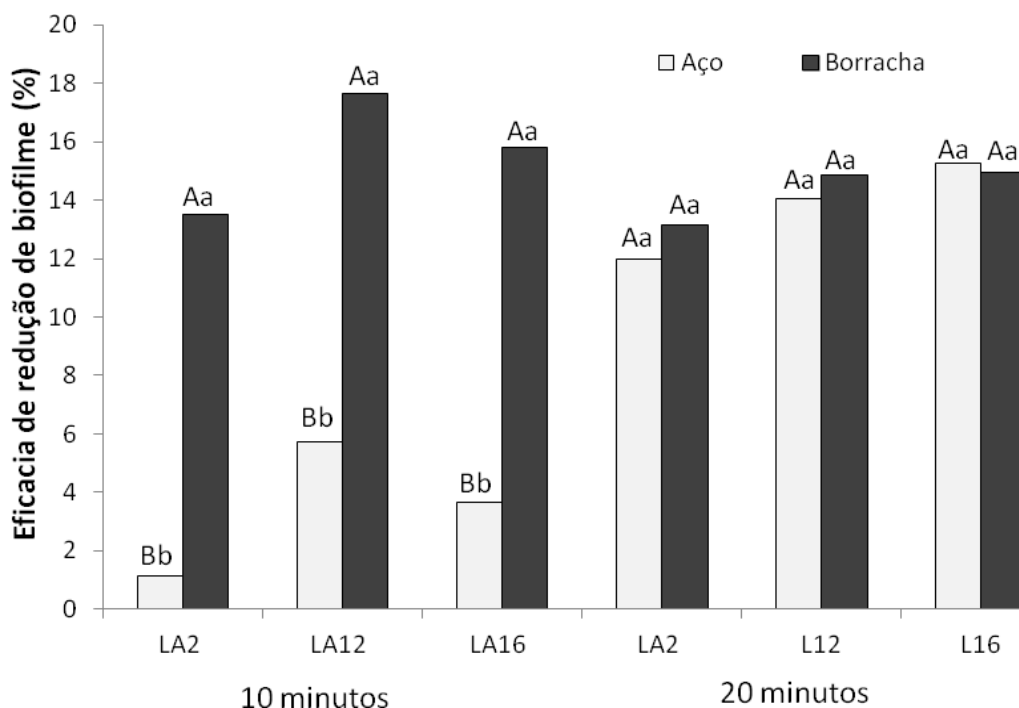
As eficácias de redução dos biofilmes de *S. aureus* formados no aço inoxidável após 20 minutos de contato com os sobrenadantes das três BALs avaliadas foram significativamente superiores a aquelas observadas após 10 minutos de contato (Figura 1,  $p < 0,05$ ). Considerando as eficácias no período de 10 minutos de contato, constatou-se maiores reduções para os

cupons constituídos por borrachas de teteiras em relação àsquelas observadas para o aço inoxidável (Figura 1,  $p < 0,05$ ).

A eficácia de redução dos sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. no tempo de 10 minutos foi maior no cupom de borracha de teteira (15,65%), provavelmente devido a maior concentração de *S. aureus* aderidos na borracha. No tempo de 20 minutos a eficácia foi igual para ambos os cupons, revelando aumento significativo de 10% para o cupom de aço comparado ao tempo de 10 minutos. O aumento de eficácia de redução no cupom de aço pode ser devido ao aumento de *S. aureus* na amostra controle no tempo de 20 minutos, pois mesmo em solução salina as bactérias continuam crescendo.

Esses resultados indicaram que os biofilmes dessa bactéria patogênica não foram totalmente removidos. Entretanto a eficácia na redução dos biofilmes poderia ser maior, concentrando-se o sobrenadante (Jaffar et al., 2016) ou extraindo componentes intracelulares das BAL (Pribul et al., 2011; Grosu-Tudor et al., 2014).

Figura 1- Eficácia de redução de biofilmes de *Staphylococcus aureus* em cupons de aço inoxidável ou borrachas de teteiras após 10 e 20 minutos de contato com sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. isolados do leite de transição fermentado



Legenda: Médias seguidas por letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os períodos avaliados e letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tipos de cupons, considerando o teste de Tukey à 5% de significância. Fórmula utilizada:  $Eficácia\% = 100 [1 - (\log \text{ de } ufc/cm^2 \text{ do tratamento} / \log \text{ de } ufc/cm^2 \text{ do controle})]$ .

Neste estudo, não foram evidenciadas diferenças significativas nas eficácias dos tratamentos providos pelas três estipes de *Lactobacillus* spp. Dessa forma os sobrenadantes dos três *Lactobacillus* spp. avaliados poderiam conter compostos semelhantes e apresentar efeitos inibitórios similares contra *S. aureus*. Futuros estudos poderiam identificar os compostos produzidos por *L. paracasei* (LA16), *L. casei* (LA12) e *L. rhamnosus* (LA2) e avaliar o mecanismo de ação frente a *S. aureus* em biofilmes maduros.

A inibição de *S. aureus* utilizando sobrenadante de *Lactobacillus* spp. poderia ser ocasionada por ácidos orgânicos, enzimas proteolíticas e peptídeos bioativos (Hor ; Liong , 2014).

Ao avaliar o potencial de redução de biofilmes de *S. aureus* CCMB262 utilizando o sobrenadante de duas estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas durante a fermentação do cacau, Melo et al. (2016) observaram redução de 91% no índice de formação de biofilmes após tratamento com sobrenadante TCUESC01 de *L. fermentum* a  $18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . No mesmo estudo esses autores também avaliaram a redução da espessura do biofilme já formado dessa bactéria, utilizando o mesmo sobrenadante e constataram redução de 80% na espessura do biofilme comparando-se com o controle.

Ao avaliar sobrenadantes de *L. bulgaricus* FTDC 8611, *W. cibaria* BD 1514h, *L. fermentum* BD 1512n, *L. fermentum* BD 8913f e *L. casei* BD 1511a, Hor; Liong, (2014) observaram que ao neutralizar proteases e o pH e precipitar proteínas, o efeito inibitório de biofilmes de *S. aureus* em placas de polipropileno foi significativamente menor comparado com os sobrenadantes sem neutralização. Dessa forma os autores indicaram que a composição proteica do princípio ativo e o efeito do pH ácido agem na inibição de *S. aureus* aderidos. Os compostos antimicrobianos nos sobrenadante avaliados atuaram sinergicamente para inibir o crescimento de *S. aureus* até causar a morte ou impedindo a agregação celular e conseqüentemente a formação de biofilme (Hor ; Liong , 2014).

Poucas pesquisas têm avaliado o sobrenadante do cultivo ou a própria massa celular de *Lactobacillus* spp. na inibição da formação ou redução de biofilmes já formados. Jaffar et al. (2016), observaram que tanto o sobrenadante concentrado de *Lactobacillus* spp. quanto as massas celulares promoveram redução de 60 e 90% respectivamente do biofilme de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4, bactéria causadora de doença periodontal, em biofilmes formados em placas de polipropileno.

## CONCLUSÃO

As estirpes de *S. aureus* avaliadas apresentaram formação de biofilmes maduros nas superfícies de aço inoxidável e borracha de teteira de ordenha mecânica e potencial de biotransferência ao leite. Os sobrenadantes dos cultivos *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. casei* possuem eficiências semelhantes na redução dos biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável quanto em borracha de teteira após 20 minutos de contato. Os compostos produzidos por essas bactérias são promissores para o desenvolvimento de novos produtos sanitizantes para

superfícies presentes na cadeia produtiva do leite. O leite de transição fermentado apresenta diversidade de espécies de BAL, que apresentam efeito inibitório do crescimento de *S. aureus*, representando alternativa para prevenção, controle e tratamento de mastites bovinas após testes *in vivo* e de toxicidade.

## REFERÊNCIAS

Andrade, C. R. G., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M., Acurcio, L. B., Sant'Anna, F. M., Castro, R. D., and Oliveira, D. L. S. (2014). In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 66(5): 1592-1600.

Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegou, G., ... and Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food microbiology*, 53: 51-59.

Arena, M. P., Capozzi, V., Spano, G., and Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7): 2641-2657.

Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G., and Gardini, F. (2009). Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *J. food protection*, 72(10): 2162-2169.

Boari, C.A., Alves, M.P., Tebaldi, V.M.R., Savian, T.V., Piccoli, R.H., 2009. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciê. Tecnol. Alim.* 29: 886-895.

Borges, M. D. F., Tiekou Nassu, R., Pereira, J. L., Colares de Andrade, A. P., and Yoshiteru Kuaye, A. (2008). Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural.* 38:1431-1438.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru

Refrigerado e seu Transporte a Granel, Diário Oficial [da] União, Brasília, 29 de dez. p. 24, 2011.

Careli, R.T., Andrade, N.J., Soares, N.F., Ribeiro Júnior, J.I., Rosado, M.S., Bernardes, P.C., 2009. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. Food Sci. Tech. (Campinas) 29:171-176.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. food protect. 61:1636-1643.

Costa, K. A. D., Ferenz, M., da Silveira, S. M., and Millezi, A. F. (2016). Bacterial biofilm formation in different surfaces of food industries. Rev. Inst. Lat. Când. Tostes, 71:75-82.

Costa, H. H. S., Souza, M. R., Acúrcio, L. B., Cunha, A. F., Resende, M. F. S., and Nunes, Á. C. (2013). Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. Arq. bras. med. vet. Zootec. 1858-1866.

Costa, H.H.S. Potencial probiótico de *Lactobacillus spp.* e *Weisella paramesenteroides* isolados de queijo minas artesanal da Serra da Canastra- MG. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Costerton JW. Introduction to biofilm. Int J Antimicrob Agents 1999; 11: 217–221. PMID: 1039497.

Coutinho E.S.F., and da Cunha G.M. (2005). Conceitos básicos de epidemiologia e estatística para a leitura de ensaios clínicos controlados. Rev. Bras. Psiquiatr.27:146-51.

Danielsen, M., and Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. Internat. J. food microb. 82:1-11.

Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., and Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. Internat. J. food microb.159:107-114.

Freiwald, A., and Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nature protocols. 4:732.

Grosu-Tudor, S. S., Stancu, M. M., Pelinescu, D., and Zamfir, M. (2014). Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. World J. Microb. Biotech.30:2459-2469.

Hor, Y. Y., and Liang, M. T. (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologica Sinica*. 32:141-147.

Jaffar, N., Ishikawa, Y., Mizuno, K., Okinaga, T., and Maeda, T. (2016). Mature Biofilm Degradation by Potential Probiotics: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* versus *Lactobacillus* spp. *PloS one*. 11:e0159466.

Melo, T. A., dos Santos, T. F., de Almeida, M. E., Junior, L. A. G. F., Andrade, E. F., Rezende, R. P., ... and Romano, C. C. (2016). Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC microbiology*. 16:250.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R., and Clemens, R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical reviews in food sci. and nutrit.* 39:13-126.

Oliveira, M. M. M. D., Brugneta, D. F., and Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev. Instit. Adolfo Lutz (Impresso)*. 69:277-284.

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*. 64:175-188.

Piccart, K., Vasquez, A., Piepers, S., De Vliegher, S., and Olofsson, T. C. (2016). Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the in vitro growth of mastitis pathogens. *J. dairy sci*. 99: 2940-2944.

Pribul, B. R., Pereira, I. A., Soares, L. D. C., Coelho, S. M., Barberis, I. L., Pascual, L., and Souza, M. M. (2011). Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Arq. bras. med. vet. Zootec*. 63:744-748.

Reyher, K. K., Dufour, S., Barkema, H. W., Des Côteaux, L., Devries, T. J., Dohoo, I. R., ... and Scholl, D. T. (2011). The National Cohort of Dairy Farms—A data collection platform for mastitis research in Canada. *J. dairy sci*. 94:1616-1626.

Ribeiro, I.C.O. Mariano E.G.A.<sup>1</sup> Careli, R.T. Morais-Costa, F. Sant'Anna, F.M. Souza, M.R. Duarte, E.R. (2017) *in press*. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. *BMC Vet. Research*.



Rossoni, E. M. M., and Gaylarde, C. C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Internat. J. food microb.* 61:81-85.

Saalfeld, M. H., GARCIA, J., and DOMINGUES, F. (2008). Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. *Hora Vet.* 162:59-62.

Saidi, R., Khelef, D., and Kaidi, R. (2013). Bovine mastitis: Prevalence of bacterial pathogens and evaluation of early screening test. *African J. Microb. Research.* 7:777-782.

Sampimon, O. C., Lam, T. J. G. M., Mevius, D. J., Schukken, Y. H., and Zadoks, R. N. (2011). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microb.* 150:173-179.

Sinde, E., and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microb.* 17:439-447.

Tagg, J.R.; Dajani, A.S.; Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews.* 40:722-756.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Internat. J. food microb.* 81:1-10.

Valderrama, W.B., Cutter, C.N., 2013. An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53:801e817.

Vidal, D. R., Ragot, C., and Thibault, F. (1996, December). Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. In *Annales pharmaceutiques francaises.* 55:49-54.

Zafalon, L. F., Langoni, H., Benvenuto, F., Castelani, L., and Broccolo, C. R. (2008). Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.* 15:56-65.

Zhou J. S., Pillidge C.J., Gopal P. K. and Gill H.S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Internat. J. Food Microb.*, 98:211-217.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite de transição fermentado possui diversidade, elevada contagem de BAL e representa fonte potencial de probióticos para bovinos devido a capacidade dessas bactérias já suportarem o pH ácido do produto fermentado.

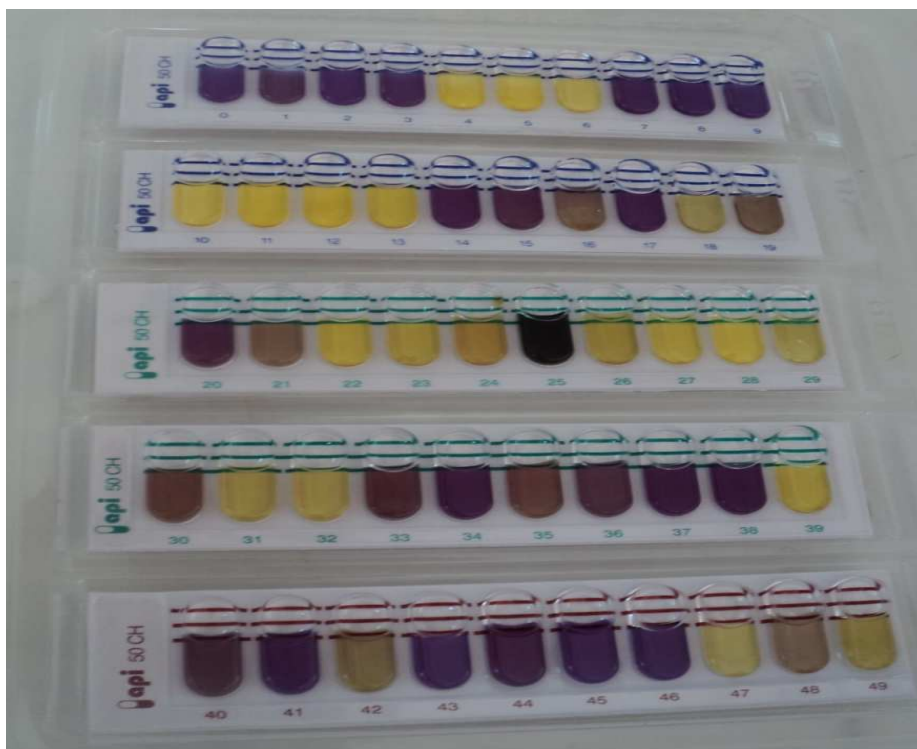
Compostos secretados por BAL podem representar alternativa para redução da administração de antimicrobianos no tratamento de colibacilose e mastite de bovinos.

Os metabólitos produzidos pelas BAL inibem o crescimento de bactérias patogênicas e são promissores na redução de biofilmes de *S. aureus* aderidos em superfícies de aço inoxidável e borracha de teteira.

Futuros estudos poderão identificar esses metabólitos com efeitos antibacterianos e caracteriza-los quanto a possível toxicidade para utilização segura como novos antimicrobianos, antissépticos e sanitizantes.

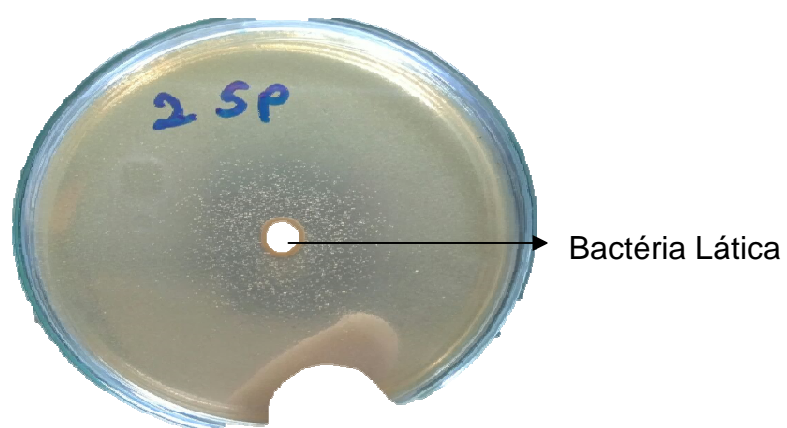
## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Galeria API



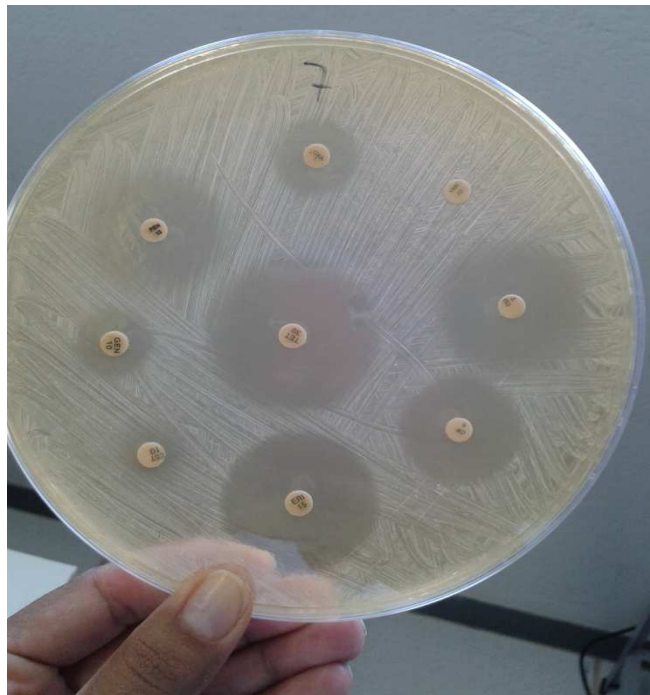
Fonte:Do autor

### APÊNDICE B – Halo de inibição de bactéria láctica contra *Staphylococcus aureus* ATCC



Fonte:Do autor

## APÊNDICE C – Sensibilidade de bactérias lácticas a antimicrobianos



Fonte:Do autor

APÊNDICE D – Cupon de borracha de teteira aderido com *Staphylococcus aureus*

Fonte:Do autor

## ANEXOS

Anexo 1. Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp. de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em testes de difusão em ágar MRS (Difco)

Antimicrobiano Nome (concentração)	Nível de Susceptibilidade		
	Resistente (mm)	Moderadamente Sensível (mm)	Sensível (mm)
Clindamicina (2µg)	≤ 8	9-11	≥ 12
Ciprofloxacina (5µg)	≤ 13	14-18	≥ 19
Eritromicina (15µg)	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicina (10µg)	≤ 12	-	≥ 13
Oxacilina (1µg)	≤ 18	19-20	≥ 21
Penicilina G (10 UI)	≤ 19	20-27	≥ 28
Tetraciclina (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomicina (30 µg)	≤ 14	15-16	≥ 17

Fonte: Adaptado de Charteris et al. (1998)