

Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína

Josiane Mangoni¹, Magali Soares dos Santos Pozza², Mayara Andressa Sabedot^{3*}, Paulo Cezar Pozza², Suzana de Almeida³ e Eduardo Luiz Heinzen³

¹Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. ²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. ³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Pernambuco, 1777, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: mayara_sabedot@hotmail.com

RESUMO. O uso de probiótico na alimentação animal tem sido indicado, por reduzir a mortalidade resultante da colonização intestinal por micro-organismos patógenos, melhorar o desempenho e as características de produção sem deixar resíduos na carne. O experimento teve como objetivo isolar, a partir de amostras de fezes de suínos na fase de aleitamento, cepas de lactobacilos visando sua identificação como probióticos. Foram isoladas 92 colônias, posteriormente submetidas à prova de catalase e 60 tiveram resultados negativos. Estas colônias negativas foram submetidas à coloração de Gram foi avaliada sua morfologia. Destas, 16 apresentaram formas de bacilos. Esses isolados foram comparados pela sua habilidade de resistência em pH 3,0, crescimento na presença de sais biliares, fenol, lisozima, e sua capacidade de hidrofobicidade e antagonista. Os isolados L03, L04, L08 e L15, identificados neste trabalho apresentam melhores características para uso como probiótico, em função de demonstrar melhor comportamento sobre as condições ácidas, crescendo na presença de sais biliares e fenol, apresentando alta percentagem de hidrofobicidade quanto à presença de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: características probióticas, trato gastrointestinal, leitões.

ABSTRACT. Potential probiotic lactobacilli of pig origin. The use of probiotic in animal nutrition has been identified as reducing mortality resulting from intestinal colonization by pathogenic micro-organisms, improving productive performance and characteristics, leaving no residue in meat. The experiment aimed to isolate lactobacilli from fecal samples of suckling swine, in order to be identified as probiotics. Ninety-two colonies were isolated; these pre-selected colonies were subjected to catalase analysis, for which 60 were negative. The 60 colonies were subjected to Gram-negative stain and evaluated for their morphology. Of these, 16 had forms of bacilli. These isolates were compared for their ability to resist pH 3.0, grow in the presence of bile salts, phenol, lysozyme, as well as their hydrophobicity and antagonistic abilities. Isolates L03, L04, L08 and L15 identified in this study showed better probiotic use, better performance under acidic conditions, growing in the presence of bile salts and phenol, with high percentage of hydrophobicity and in the presence of inhibiting *Escherichia coli*.

Keywords: probiotic characteristics, gastrointestinal tract, piglets.

Introdução

A sociedade moderna exige, de forma cada vez mais intensa, que os alimentos apresentem qualidade, custo acessível e, acima de tudo, segurança. Além disso, há grande preocupação de que esses alimentos não sejam produzidos às custas do uso exacerbado ou do esgotamento dos recursos naturais. Nas últimas décadas, a produção de carne suína vem sendo intensificada por avanços significativos nas áreas da genética, nutrição, ambiência e reprodução.

A suinocultura brasileira é uma das mais desenvolvidas do mundo e produz carne a um dos menores custos. Assim, o Brasil é um dos grandes

competidores no mercado mundial. A produção de suínos no Sul do Brasil pode ser considerada como a mais tecnificada da América do Sul.

Os probióticos, são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos (FÜLLER, 1989) que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam benéficamente o hospedeiro animal por melhorar o equilíbrio da microflora intestinal. Quando estes probióticos são incorporados, em alimentos como parte do processo de elaboração ou aditivos, geram alimentos funcionais, que afetam de maneira positiva e promovem efeito fisiológico ao organismo.

O uso de probióticos na alimentação animal tem sido indicado, por reduzir a mortalidade resultante

da colonização intestinal por organismos patogênicos, melhorar o desempenho e as características de produção sem deixar resíduos prejudiciais na carne (FÜLLER; COLE, 1988). A manutenção de uma microbiota intestinal estável com o uso de probióticos, serve como barreira contra microrganismos potencialmente patogênicos e propicia a obtenção de bons resultados zootécnicos (MULDER, 1991).

Os probióticos, quando ingeridos, encontram meio adequado para multiplicação, colonizam o trato digestivo e se estabelecem sobre outros microrganismos aí presentes. Uma vez estabilizada, a microbiota do trato digestivo previne a colonização por outra bactéria (EDENS et al., 1997).

A ação desses microrganismos parece ser por meio de inibição competitiva, principalmente de *Escherichia coli*, ou alteração do pH intestinal, pela produção de lactato, favorecendo o desenvolvimento daqueles microrganismos que beneficiam o hospedeiro, promovendo aumento de ganho de peso e melhora da eficiência alimentar. Vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. Os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal. Estes micro-organismos não devem transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e podem apresentar preferencialmente propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas (SALMINEN et al., 1998).

O objetivo do presente trabalho foi isolar, a partir de amostras de fezes de suínos, na fase de aleitamento, cepas de lactobacilos para posterior avaliação quanto tolerância de substâncias inibidoras e condições ácidas, como também avaliar o efeito antagonístico de inibição de bactérias patogênicas como a *Escherichia coli*, visando o uso destes isolados como probióticos.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Marechal Cândido Rondon, onde se procedeu o isolamento e identificação de cepas de lactobacilos para posterior avaliação quanto à tolerância de substâncias inibidoras, condições ácidas dos isolados como também efeito antagonístico de inibição de bactérias patogênicas.

Foram coletadas por meio de swab nove amostras das fezes de nove leitões sem sinais clínicos de patologia na fase de maternidade de três a dez dias de idade. Os animais pertenciam a uma propriedade

localizada no município de Marechal Cândido Rondon, no Oeste do Estado do Paraná. Foi pesado 1 g da amostra e adicionado em 10 mL de caldo Rogosa (LBS) estéril em autoclave a 121°C por 15 min. e incubado a 37°C por 24h sob microaerofilia. Para o isolamento das bactérias, foram realizadas estrias por esgotamento com auxílio da alça de platina sendo utilizado o Ágar MRS estéril (DE MAN et al., 1960), com pH ajustado para 5,4 adicionado de acetato e púrpura de bromocresol, com incubação a 37°C.

As colônias que mostraram características típicas de *Lactobacillus* spp. no Ágar MRS, foram transferidas assepticamente com alça de platina, para tubos contendo caldo MRS estéril. Após incubação dos tubos a 37°C durante 24h, os tubos que apresentaram crescimento (turvação), foram submetidos à coloração de Gram, de esporos (utilizando corante verde malaquita) e ao teste de catalase (produção de catalase verificada pela adição de peróxido de hidrogênio nas lâminas). Todos os cultivos que apresentaram formas de bastonetes Gram positivos, catalase negativa, não-esporogênicos e estáveis às repicagens em termos de manutenção da atividade foram selecionados. A reativação dos isolados foi realizada a partir de 1% (v v⁻¹) das culturas congeladas, inoculadas em caldo MRS e, posteriormente, incubadas a 37°C durante 24h. Este procedimento foi repetido três vezes.

Para a avaliação da habilidade de crescimento na presença de sais biliares das culturas isoladas foi utilizada a técnica descrita por Lin et al. (1991) e Neumann e Ferreira (2000). Após reativação em caldo MRS, as culturas foram repicadas na proporção de 1% (v v⁻¹) mL em caldo MRS adicionado de 0,3% de sais de bile (p v⁻¹) e incubadas a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6h. Paralelamente, foi determinada a absorbância de um cultivo-controle inoculado e incubado sob as mesmas condições, porém, isento de bile.

A tolerância ao fenol foi verificada inoculando-se 1% (v v⁻¹) da cultura ativa em 100 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) estéril a 10%, contendo 0,3% de solução fenol (SANTOS et al., 2003). Posteriormente foram incubadas por 48h e após este período foi determinado o pH e a acidez titulável com NaOH 0,1 N.

Para determinação de resistência dos isolados à enzima lisozima foram inoculados 2% (v v⁻¹) da cultura ativa em 10 mL de caldo MRS sem e com lisozima e, posteriormente, incubados a 37°C por 24h. O crescimento foi verificado nos tempos 0 e após 24h em placas de Petri contendo Agar MRS.

A hidrofobicidade relativa de superfície celular das culturas dos lactobacilos foi determinada usando o teste de adesão do micro-organismo ao hidrocarboneto, de acordo com Flint (1997). As culturas foram centrifugadas a 3.000 xg durante 10 min. e as células assim obtidas foram ressuspensas em 10 mL de água destilada estéril até atingir uma D.O₆₀₀ entre 1,2 a 1,6. Alíquotas de 3 mL de cada suspensão de células foram adicionadas a igual volume de xileno e homogeneizadas durante aproximadamente 5 segundos em um vórtex. Em seguida, após 10 min. de incubação a 30°C, as amostras foram vigorosamente agitadas em vórtex por 2 min. à temperatura ambiente. Após repouso de 20 min., houve a separação das fases e a absorvância da fase aquosa foi medida a 600 nm. A porcentagem de hidrofobicidade foi determinada a partir da D.O. inicial da suspensão bacteriana (A_1) e da D.O. da fase aquosa após a separação (A_p) usando a fórmula $(A_1 - A_p) / A_1 \times 100$.

A capacidade dos isolados de crescerem em diferentes temperaturas foi avaliada utilizando-se culturas ativas inoculadas na proporção de 1% (v v⁻¹) em tubos contendo 10 mL de caldo LDR (leite desnatado reconstituído a 10%) e incubadas a 15°C por 15 dias, a 37°C por dois dias e a 45°C por três dias. O crescimento foi observado pela formação de coágulo no leite no tempo indicado.

Para o teste de efeito Antagônico dos Isolados, utilizando o Método de Multicamadas, foram adicionados 7 mL de caldo MRS com 1,4% de Ágar estéril distribuídos de forma asséptica em placas de Petri, constituindo assim a primeira camada de meio. Após a solidificação, foi colocada uma segunda camada de caldo MRS, contendo 0,7% de Ágar, inoculado com os lactobacilos e diluído para obter um número entre 20 e 100 UFC por placa. A terceira camada era constituída de caldo MRS com 0,7% de Ágar com inóculo (isolados ativos). As placas assim preparadas foram incubadas a 37°C durante três dias e após esse período colocada uma última e quarta camada de MRS com 0,7% de Ágar, inoculado com cepas patogênicas de *Escherichia coli* (obtidas do Banco de Culturas Fiocruz, Estado do Rio de Janeiro), incubadas em caldo BHI (Infusão de Cérebro e coração) por 20h a 37°C (DIEP et al., 1995), sendo observado se houve crescimento da bactéria patogênica.

Para a determinação de células viáveis sobre resistência a condições ácidas (LIN; CHEN, 2000) dos isolados foi utilizado um esquema fatorial 2 x 4 x 16, sendo dois valores de pH (caldo MRS com pH 3,0 e 6,5 ajustado pela adição de HCl), 4 tempos (0, 1, 2 e 3h) e 16 isolados.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2002). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Foram isoladas de amostras de fezes de leitões, 92 colônias, e 60 delas foram negativas quando submetidas à prova de catalase. As 60 colônias catalase negativas foram submetidas à coloração de Gram para avaliação de suas morfologias. Destas 60, 16 colônias apresentaram formas de bacilos.

Os resultados de resistência à acidez dos isolados selecionados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Crescimento (log UFC mL⁻¹) dos isolados expostos ao ácido clorídrico (HCl 0,1 M) por até 3h.

Isolados	Tempo (hs)			
	0	1	2	3
L01 cont ¹	7,58 a	6,65 a	7,30 a	7,30 a
L01 pH 3,0	7,09 b	5,63 b	0,00 b	0,00 b
L02 cont	7,55 a	7,67 a	7,65 a	6,09 a
L02 pH 3,0	6,33 b	5,43 b	0,00 b	0,00 b
L03 cont	6,08 b	7,41 a	7,03 a	7,13 a
L03 pH 3,0	7,25 a	6,24 b	6,71 b	4,99 b
L04 cont	6,95 a	5,6 a	6,56 a	7,05 a
L04 pH 3,0	6,78 b	6,62 b	4,63 b	4,44 b
L05 cont	6,70 b	6,59 a	6,41 a	6,62 a
L05 pH 3,0	7,34 a	3,35 b	0,00 b	0,00 b
L06 cont	6,75 a	7,40 a	7,19 a	6,96 a
L06 pH 3,0	6,23 a	4,42 b	0,00 b	0,00 b
L07 Cont	8,26 a	7,53 a	8,09 a	8,14 a
L07 pH 3,0	8,01 b	4,41 b	1,98 b	0,00 b
L08 Cont	6,99 a	7,26 a	7,21 a	7,52 a
L08 pH 3,0	6,95 b	3,53 b	3,27 b	3,55 b
L09 Cont	8,00 b	8,02 a	7,41 a	7,16 a
L09 pH 3,0	8,38 a	4,45 b	2,19 b	0,00 b
L10 Cont	7,28 b	6,20 a	7,69 a	8,02 a
L10 pH 3,0	7,29 a	2,27 b	1,19 b	0,00 b
L11 Cont	6,99 a	7,07 a	7,05 a	7,04 a
L11 pH 3,0	6,80 b	5,33 b	2,67 b	0,00 b
L12 Cont	6,60 a	6,70 a	6,70 a	6,74 a
L12 pH 3,0	5,94 b	5,20 b	0,00 b	0,00 b
L13 Cont	6,72 b	6,99 a	7,02 a	6,85 a
L13 pH 3,0	6,81 a	3,71 b	0,00 b	0,00 b
L14 Cont	6,79 a	6,76 a	6,84 a	6,76 a
L14 pH 3,0	6,10 b	5,24 b	2,61 b	2,56 b
L15 Cont	6,80 a	7,13 a	6,96 a	6,77 a
L15 pH 3,0	6,34 a	5,37 b	4,37 b	4,33 b
L16 Cont	6,57 a	6,69 a	6,77 a	6,88 a
L16 pH 3,0	6,49 b	6,20 b	0,00 b	0,00 b

¹pH controle; *Valores médios provenientes de três repetições em log (UFC mL⁻¹). Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a (p < 0,05).

Pela Tabela 1, pode ser observado que os isolados L03, L04, L07, L08, L09, L10, L11, L14 e L15 resistiram ao pH 3,0 nos tempos de 0, 1 e 2h, já os isolados L03, L04, L08, L14 e L15 resistiram ao pH 3,0 até o tempo de 3h, indicando que esses isolados suportam melhor a passagem pelo estômago do animal.

Verificou-se que no tempo 0 não houve diferença significativa nas contagens, entre pH controle e pH 3,0 nos isolados L 6 e L15. Para todos

os isolados houve diferença significativa nos tempos 1, 2 e 3h (Tabela 1).

Martins (2006), avaliando o perfil de resistência a pH baixo das culturas isoladas de fezes de suínos, verificaram que apenas 18% dos isolados obtiveram menos que 1 RD (Redução Decimal) quando cultivados em meio com pH ajustado a 3,0. Cerca de 36,5% apresentaram RD entre 1 e 2 e 45,5% tiveram mais que 2 RD. Nenhum dos isolados avaliados neste estudo teve capacidade de crescer em meios específicos com o pH ajustado para 3,0.

As culturas L03 e L14 foram consideradas resistentes por apresentarem crescimento rápido, e atingiram um valor de D.O. 0,513 e 0,525 em 5 e 6h, porém verificou-se que as curvas de crescimento destas culturas não são semelhantes. O isolado L03 apresentou rápido crescimento entre o tempo 4 e 5h, onde o valor da D.O. foi de 0,038 para 0,513 e assim manteve-se até o tempo de 6h (Figura 1), já a cultura L14, manteve um crescimento gradativo e uniforme atingindo um valor de D.O. 0,525 em 6h (Figura 2).

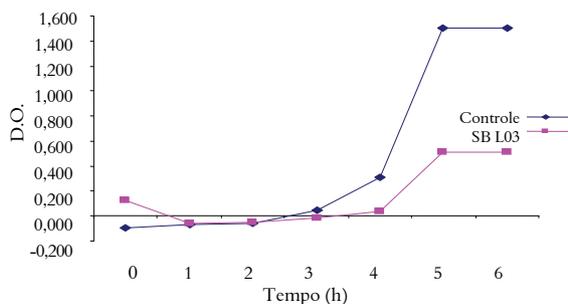


Figura 1. Curva de crescimento do isolado L03 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

As culturas que apresentaram desenvolvimento rápido foram consideradas tolerantes, sendo elas as cepas L01, L02, L05 e L08. Esses isolados não atingiram valor de D.O. 0,3 em 6h, obtendo os seguintes valores 0,122; 0,127; 0,132 e 0,129 respectivamente.

As culturas L10 e L15 obtiveram crescimento baixo perante aos outros isolados na presença de sais biliares se mantendo ativas, porém, sem um crescimento contínuo, apresentando-se pouco tolerantes. Já as culturas L04, L06, L07, L09, L11, L12 e L13 não apresentaram crescimento em nenhum dos tempos estudado, sendo consideradas intolerantes na presença de sais biliares.

Em um estudo realizado por Martins (2006), somente cerca de 36,5% dos isolados cresceram em meio de cultivo adicionado de 0,3% de sais biliares. Du Toit (1998), isolando lactobacilos das fezes de

suínos observaram que nem todas as cepas apresentaram crescimento na presença de sais biliares das cepas encontradas estes autores constataram que 64,3% tiveram capacidade de hidrolisar sais biliares.

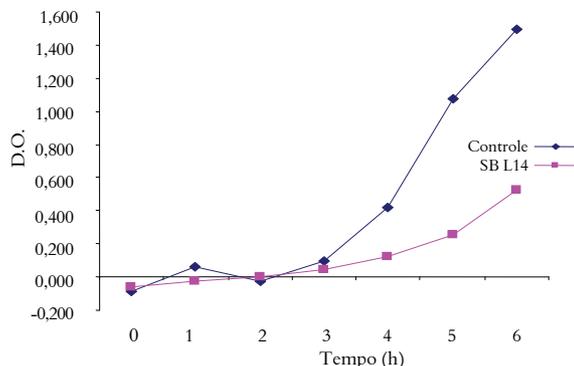


Figura 2. Curva de crescimento do isolado L14 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de sais biliares.

Os isolados selecionados foram testados verificando sua tolerância ao fenol, seus respectivos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Equações de regressão e estimativa dos coeficientes de determinação (R^2) dos isolados que resistiram após 3h em pH 3,0.

Isolados	Equação	Coefficiente de determinação (R^2)
L03	$0,3608x^2 - 1,0715x + 7,18017$	0,50*
L04	$-0,02833x^2 - 0,84433x + 6,964$	0,83**
L07	$0,4025x^2 - 3,85317x + 7,9735$	0,99**
L08	$0,92417x^2 - 3,81683x + 6,81983$	0,96**
L09	$0,435x^2 - 4,045x + 8,3$	0,99**
L10	$0,95667x^2 - 5,16667x + 7,0933$	0,97**
L15	$0,2525x^2 - 1,45517x + 6,40483$	0,96**
L14	$0,20417x^2 - 1,93817x + 6,3235$	0,90**
L11	$-0,30167x^2 - 1,40233x + 6,86267$	0,99**

* e ** significativo pelo teste F em nível de 1 e 5% de significância, respectivamente.

Os isolados L07, L08, L09 apresentaram maior percentagem de acidez na presença de fenol e assemelharam-se estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, diferindo dos isolados L02, L03, L04, L05, L06 e L10 os quais apresentaram baixa acidificação na presença de fenol. Seus respectivos valores de pH foram: 5,89; 5,64; 5,89; 5,86; 6,07 e 6,01 (Tabela 3).

Os isolados L03, L06, L10, L11 e L14 apresentaram uma maior percentagem de redução. Já os isolados L01, L04, L05, L08, L12, L15 e L16, apresentaram uma menor percentagem de redução.

Segundo Ronka et al. (2003), esses valores de pH estão acima do considerado desejável a um produto fermentado, pois esses deveriam oscilar entre 4,4 e 4,6. Portanto, esses isolados apresentaram baixa acidificação do leite durante o período de incubação.

Tabela 3. Valores determinados de pH e porcentagem de acidez titulável dos isolados cultivados em LDR (leite desnatado reconstituído) a 10% sem e com adição de 0,3% de fenol, incubados por três dias a 35°C.

	pH controle	pH com fenol	% Acidez controle	% Acidez com fenol	% Redução
L01	5,41	5,61	0,4213	0,3933ab	6,64
L02	5,70	5,89	0,3536	0,3094b	12,50
L03	5,54	5,64	0,3992	0,2725b	31,73
L04	5,69	5,89	0,3421	0,3094b	9,55
L05	5,75	5,86	0,2666	0,2460b	7,72
L06	5,99	6,07	0,3550	0,2950b	22,91
L07	5,34	5,55	0,4965	0,4331a	12,76
L08	5,54	5,70	0,4207	0,4036a	4,06
L09	5,51	5,59	0,5180	0,4243a	18,05
L10	5,54	6,01	0,3903	0,2976b	23,75
L11	5,65	5,77	0,6568	0,3642ab	44,54
L12	5,54	5,76	0,4081	0,3801ab	6,86
L13	5,58	5,84	0,4198	0,3727ab	11,21
L14	5,60	5,92	0,5186	0,3727ab	28,13
L15	5,63	5,92	0,3885	0,3535ab	9,00
L16	5,49	5,80	0,4115	0,3948ab	4,05

*Valores médios provenientes de três repetições. % redução = % de acidez sem fenol - % de acidez com fenol / % de acidez sem fenol. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à resistência dos isolados à enzima lisozima, pode-se observar que os isolados L03, L05, L06, L09, L10, L11, L12, L13, L14 e L16 tiveram seu desenvolvimento afetado ($p < 0,05$) quando na presença deste agente inibidor (crescimento-Delta) as demais cepas foram consideradas resistentes (Tabela 4).

Tabela 4. Delta de crescimento dos isolados na ausência e presença da enzima lisozima após 24h.

Isolados	Lisozima	
	Ausência (MRS controle)	Presença (MRS + Lisozima)
L01	2,00a	1,91a*
L02	2,36a	2,15a
L03	2,16a	1,79b
L04	1,18a	0,97a
L05	2,31b	2,60a
L06	1,14a	0,85b
L07	1,83a	2,49a
L08	1,88a	1,34a
L09	2,91a	1,80b
L10	1,28b	1,80a
L11	1,53a	1,02b
L12	1,28 ^a	0,75b
L13	2,48a	1,66b
L14	3,08a	1,41b
L15	1,68a	1,50a
L16	2,31a	1,69b

*Valores médios provenientes de três repetições, expressos em log (UFC mL⁻¹). Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível 5% de probabilidade.

Chaves (1999), verificou que os isolados, em sua totalidade, apresentaram taxas de lises bem inferiores a do *Micrococcus lysodeikticus* (microrganismo usado como controle de lise), que foi de 0,63% de transmitância minuto⁻¹ para a lisozima do ovo e 1,82% para a lisozima do leite bovino.

Nos resultados obtidos, (Tabela 5), verificou-se que o isolado L15 apresentou a maior média e assemelhando-se estatisticamente aos isolados L09,

L10 e L11 por apresentar maior porcentagem de hidrofobicidade, porém, o L15 difere-se estatisticamente dos isolados L07 e L08, pois apresentaram menor média de hidrofobicidade.

Gopal (2001) compararam as propriedades de adesão *in vitro* de três cepas probióticas de *Lactobacillus*, entre elas, o *L. helveticus*, em diferentes células intestinais humanas, incluindo HT-29 e Caco-2 e HT29-MTX, e encontraram uma forte adesão das três cepas.

Tabela 5. Hidrofobicidade de superfície das culturas isoladas.

Isolados	Média	
L03	75,793	b
L04	78,550	b
L07	5,020	c
L08	11,330	c
L09	82,920	ab
L10	82,120	ab
L11	80,715	ab
L14	76,810	b
L15	92,600	a

*Valores obtidos sob curva de crescimento medido a 620 nm. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, na coluna, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os isolados L03, L04, L07, L08, L19, L10, L11, L14 e L15 não cresceram a 15°C em meio LDR. Já a 45°C os isolados L03, L07, L08, L19 e L10 apresentaram bom desenvolvimento e a 37°C somente os isolados L08 e L11 apresentaram crescimento.

Gilliland (1996) verificou que o *Lactobacillus acidophilus* se caracteriza por não crescer a temperaturas de 15°C ou menores. De acordo com Reque (2000), os *Lactobacillus fermentum* tiveram crescimento à temperatura de 45°C, mas não obtiveram crescimento em seus isolados a 15°C.

As bactérias isoladas foram testadas com relação a sua capacidade de inibir *Escherichia coli*. Os testes realizados para verificar a atividade inibidora da cultura probiótica apresentaram resultados negativos, e os isolados L03, L04, L08 e L09 foram capazes de inibir a *Escherichia coli*.

Martins (2006) não detectaram nenhum halo de inibição no teste de antagonismo realizado entre os isolados, indicando a possibilidade de cultivo simultâneo. Por outro lado, Dabés et al. (2001) isolaram BAL (bactéria ácido lácticas) de produtos cárneos, verificando que 79,5% das cepas estudadas não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados.

Conclusão

Os isolados L03, L04, L08 e L15, identificados neste trabalho apresentam melhores características para uso como probióticos, por demonstrar bom comportamento sobre as condições ácidas, crescendo na presença de sais biliares e fenol,

apresentando boa percentagem de hidrofobicidade e inibindo a presença de *Escherichia coli*, portanto, cumprindo de modo eficiente as características desejadas no processo de seleção.

Referências

- CHAVES, A. H. Seleção de isolados de *Lactobacillus acidophilus* usados como probiótico em bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 1093-1101, 1999.
- DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 136-140, 2001.
- DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n.5, p. 130-135, 1960.
- DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; NES, I. F. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. **Molecular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 631-639, 1995.
- DU TOIT, M. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 93-104, 1998.
- EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R.; CASA, I. A.; DOBROGOSZ, W. J. Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Science**, v. 76, n. 5, p. 179-196, 1997.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA, 2002.
- FLINT, J. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 8, p. 1305-1314, 1997.
- FÜLLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.
- FÜLLER, R.; COLE, C. B. The scientific basis of the probiotic concept. In: STARK, B. A.; WILKINSON, J. M. (Ed.). **Probiotic**: theory and applications. Marlow: Chalcombe Publications, 1988. p. 1-14.
- GILLILAND, S. E. Special additional cultures. In: COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. (Ed.). **Dairy starter cultures**. London: VHC Publishers, 1996. p. 233-247.
- GOPAL, P. K. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR 20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 207-216, 2001.
- LIN, M. Y.; CHEN, T. W. Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 8, n. 2, p. 97-102, 2000.
- LIN, M. Y.; SAVAIANO, D.; HARLANDER, S. Influence of non fermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 87-95, 1991.
- MARTINS, O. D. A. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microorganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 5, n. 1, p. 53-59, 2006.
- MULDER, R. W. A. W. Probiotics as a tool against *Salmonella* contamination. **World Poultry**, v. 7, n. 21, p. 36-37, 1991.
- NEUMANN, E.; FERREIRA, C. L. L. F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: in vitro susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 1, p. 59-65, 2000.
- REQUE, E. F.; PANDEY, A.; FRANCO, S. G.; SOCCOL, C. R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 303-307, 2000.
- RONKA, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 63-74, 2003.
- SALMINEN, S. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v. 1, n. 8, p. 147-171, 1998.
- SANTOS, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; GOMES, P. C.; SANTOS, J. L.; POZZA, P. C.; TESHIMA, E. influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecologia**, v. 27, n. 6, p. 1395-1400, 2003.

Received on March 29, 2010.

Accepted on November 22, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.