

Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves

[Comparison between biochemical and polymerase chain reaction methods for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from chickens]

M.R. Barros¹, R.L. Andreatti Filho¹, D.E. Oliveira², E.T. Lima¹, A.J. Crocchi³

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP
Distrito de Rubião Júnior
18618-000 – Botucatu, SP

²Faculdade de Medicina - UNESP – Botucatu, SP

³Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu, SP

RESUMO

Lactobacilos foram isolados do ingluvío e cecos de reprodutoras pesadas e caracterizados como Gram-positivo, catalase negativo, produtores de gás em glicose e não produtores de H₂S em *triple sugar iron* e pela fermentação de carboidratos. Utilizaram-se os iniciadores: *Lac 1/23-10C* para detecção de *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gasseri*, *L. helveticus* e *L. jensenii*; *Lac 2/LU-1'* para *L. acidophilus*; *Fer 3/Fer 4* para *L. fermentum*; *Reu 1/Reu 2* para *L. reuteri* e *Sal 1 e Sal 2* para *L. salivarius*. *L. reuteri* e *L. salivarius* foram identificados pela reação em cadeia de polimerase (PCR) e pelo teste bioquímico, enquanto *L. acidophilus*, *L. fermentum* e *Lactobacillus* sp. somente pelo teste bioquímico. Os resultados obtidos na PCR foram mais precisos quando comparados aos obtidos com o método bioquímico, que demonstrou ser subjetivo devido às variações na fermentação de carboidratos, principalmente na diferenciação entre *L. fermentum* e *L. reuteri*.

Palavras-chave: galinha, reprodutora de frango de corte, identificação bioquímica, *Lactobacillus*, PCR

ABSTRACT

Lactobacilli were isolated from crops and ceca of broiler breeders and characterized by positive Gram staining, negative catalase test, production of gas from glucose, and negative for H₂S production from *triple sugar iron*, and carbohydrates fermentation. Primers: *Lac1/23-10C* for detecting *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, and *L. jensenii*; *Lac2/LU-1'* for *L. acidophilus*; *Fer3/Fer4* for *L. fermentum*; *Reu1/Reu2* for *L. reuteri*, and *Sal1/Sal2* for *L. salivarius* were used. *L. reuteri* and *L. salivarius* were identified by both polymerase chain reaction (PCR) and biochemical tests. However, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, and *Lactobacillus* sp. were only identified by biochemical tests. PCR results were more precise, considering the variability of carbohydrate fermentation among the strains, especially for identifying *L. fermentum* and *L. reuteri*.

Keywords: chicken, broiler breeders, biochemical identification, *Lactobacillus*, PCR

INTRODUÇÃO

A colonização da mucosa intestinal é composta por grande e diversificado número de bactérias, sendo considerada normal no homem e nos animais, incluindo as aves (Miles, 1993). Dentre os principais gêneros bacterianos identificados nesta microbiota, invariavelmente é observada a

presença de *Lactobacillus* spp. (Salanitro et al., 1978; Oyarzabal e Conner, 1995).

Os *Lactobacillus* são componentes importantes da microbiota do trato respiratório (Kawaguchi et al., 1991), ingluvío (Sarra et al., 1992) e intestinos de aves. Dentre os *Lactobacillus* heterofermentativos intestinais, o *L. fermentum*

Recebido em 21 de setembro de 2007

Aceito em 16 de março de 2009

E-mail: merciarbpe@yahoo.com.br

foi considerado por Lerche e Reuter (1962) como espécie dominante nos intestinos. Kandler et al. (1980) descreveram este biótipo, segundo dados de homologia genômica, como uma nova espécie heterofermentativa denominada *L. reuteri*. As espécies de *L. fermentum* e *L. reuteri* são fenotipicamente relacionadas, e sua diferenciação baseada em métodos bioquímicos é duvidosa (Reuter, 1997).

O gênero *Lactobacillus* é composto por mais de 60 espécies, cuja identificação de acordo com critérios fisiológicos e bioquímicos, é trabalhosa e ambígua (Kandler e Weiss, 1986; Nour, 1998).

Métodos moleculares de análise do genoma bacteriano são úteis para se diferenciar essas duas espécies, sendo importantes para a classificação taxonômica (Klein et al., 1998). O desenvolvimento de protocolos de identificação baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR) tem gerado novas possibilidades para identificação precisa e rápida das bactérias acidoláticas (Torriane et al., 1999).

A importância das espécies de *Lactobacillus* nos processos industriais ou na saúde humana e animal tem estimulado o desenvolvimento de métodos de genética molecular para identificação de espécies desse gênero (Chagnaud et al., 2001).

O objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar *Lactobacillus* spp. de aves por meio do teste bioquímico e PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 aves reprodutoras comerciais da linhagem Ross, com 52 e 65 semanas de idade, como doadoras de Inglúvio e cecos. Imediatamente após o sacrifício por deslocamento cervical das aves, foram coletados assepticamente o Inglúvio e cecos, que foram colocados individualmente em tubos contendo 10mL de caldo MRS pH 6,5. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas e a 37°C e 45°C por 12 e 18 horas em condições de anaerobiose (Anaerobac). Após esse período, os caldos foram semeados em placas de Petri contendo ágar MRS e incubados a 37°C por 24 e 48 horas.

Para verificação da pureza das estirpes, realizou-se o plaqueamento bacteriano em ágar DeMan,

Rugosa-Sharpe (MRS)¹, cultivados em jarra de anaerobiose contendo o sistema Anaerobac², com incubação a 37°C por 48 horas. Posteriormente, as colônias de cada estirpe foram submetidas às provas de coloração de Gram (Pelczar et al., 1981), teste de catalase (Sharpe, 1981), produção de gás em glicose (Collins e Hartlein, 1982) e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em açúcar *triple sugar iron* (TSI), conforme Sneath et al. (1986).

Para a realização do teste bioquímico, as estirpes isoladas de aves (EIAs) foram semeadas em caldo MRS modificado (sem extrato de carne e glicose, adicionando-se 0,002% de púrpura de bromocresol como indicador) e acréscimo individual de 1% de um dos seguintes carboidratos: arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, glicose, lactose, manitol, maltose, manose, rafinose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose e xilose, incubadas a 37°C por 48 horas (Kandler e Weiss, 1986).

Foram utilizadas como controle estirpes de referência de *Lactobacillus acidophilus* da Korean Collection for Type Cultures, #KCTC3111, obtidas do Instituto de Tecnologia de Alimentos, e de *L. fermentum* (CCT 2571), *L. reuteri* (CCT 3433) e *L. salivarius* (CCT 3752) da Coleção de Cultura Tropical, obtidas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

Todas as estirpes de referência e 10% das EIAs foram semeadas no API 50 CHL[®], incubadas aerobicamente a 37°C por 48 horas.

A extração do DNA das amostras foi realizada segundo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2006). Em síntese, 250µL da suspensão bacteriana proveniente do caldo MRS acondicionados em tubo de microcentrifuga 1,5mL foram acrescidos de 100µL de cloreto de sódio 5M e 100µL de solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65°C. Após agitação e incubação das amostras por 10min a 65°C, realizou-se purificação do DNA extraído com solução clorofórmio/álcool-isoamílico 24:1. As amostras foram homogeneizadas e, em seguida,

¹Difco – Kansas, EUA.

²Probac do Brasil – São Paulo, Brasil.

Comparação entre método bioquímico...

centrifugadas por 5min a 20.800 x g temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado etanol absoluto gelado (-20°C). Depois de incubadas por 10min a -20°C, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 20min a 20.800 x g para precipitação do DNA. Após remoção do etanol absoluto, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% (temperatura ambiente) e centrifugado a 20.800 x g por 10min, repetindo-se esse procedimento por duas vezes. Após secagem a 56°C por 15min em banho-seco, o pélete de DNA foi ressuscitado em 50µL de solução TE (Tris-HCL 10mM/EDTA 1mM) pH 8,0. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria, normalizadas a 0,1µg/µL e estocadas a -20°C até a sua utilização na PCR.

Os iniciadores utilizados são apresentados na Tab. 1. Inicialmente, as amostras foram submetidas à PCR multiplex (reação A) para

triagem das estirpes *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*. Amostras negativas nessa triagem foram avaliadas em PCR com os iniciadores *Lac1* e *23-10C*, que amplificam segmento do genoma de *L. acidophilus*, e os iniciadores grupo-específicos *Lac2* e *LU-1'*, que amplificam região conservada do genoma das estirpes *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. helveticus* e *L. jensenii* (reação B). Os componentes das PCRs e o perfil de ciclagem estão indicados na Tab. 2. Em todos os experimentos, foram utilizados controles positivos (DNA extraído das estirpes-referência) e negativos (reação contendo todos os componentes da PCR, exceto DNA bacteriano). O produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose contendo 2% de brometo de etídio e marcadores de peso molecular, com intervalos de tamanhos moleculares de 50pb ou 100pb.

Tabela 1. Iniciadores para identificação das estirpes estudadas de *Lactobacillus*

Microrganismo	Iniciadores (5' – 3')	Amplicon
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L.</i> <i>helveticus</i> e <i>L. jensenii</i>	<i>Lac 1</i> : CCTCTTCGCTCGCCGCTACT <i>23-10C</i> : ATTGTAGAGCGACCGAGAAG	300pb
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lac 2</i> : TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC <i>LU-1'</i> : CCTTCCCTCACGGTACTG	210pb
<i>L. fermentum</i>	<i>Fer 3</i> : ACTAATTGACTGATCTACGA <i>Fer 4</i> : TTCACTGCTCAAGTAATCATC	192pb
<i>L. reuteri</i>	<i>Reu1</i> : CAGACAATCTTTGATTGTTTAG <i>Reu4</i> : GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC	303pb
<i>L. salivarius</i>	<i>Sal1</i> : AATCGCTAAACTCATAACCT <i>Sal2</i> : CACTCTTTGGCTAATCTT	411pb

(Song et al., 2000)

Tabela 2. Composição das reações e perfil de termociclagem para identificação de estirpes de *Lactobacillus*

PCR/Iniciador	Composição	Perfil de termociclagem
Reação A <i>Fer3</i> , <i>Fer4</i> , <i>Reu1</i> , <i>Reu4</i> , <i>Sal1</i> e <i>Sal2</i>	Tampão para PCR 1x, 2,50mM de cloreto de magnésio, 0,20mM de dNTPs, 0,4µM de cada iniciador, 1,25U de Taq DNA polimerase e 2µL de DNA a 0,1µg/µL em 25µL de reação.	94°C–5min (1x); 94°C–1min, 57°C–30s, 72°C–1min (40x); 72°C–7min(1x)
Reação B <i>Lac1</i> , <i>23-10C</i> , <i>Lac2</i> e <i>LU-1'</i>	Idem acima	Idem acima

Para comparação do método bioquímico e PCR na identificação dos isolados provenientes do ingluvío e cecos, usaram-se os testes de McNemar e qui-quadrado (Zar, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 366 estirpes que se revelaram positivas no teste de coloração de Gram, negativas no teste de catalase, positivas na produção de gás em glicose e negativas na produção de H₂S em TSI

foram consideradas compatíveis com o gênero *Lactobacillus*.

A leitura da fermentação dos carboidratos referente ao teste bioquímico foi realizada por meio da tabela do manual Bergey's para identificação de espécies. Os isolados, obtidos do ingluvío e cecos das aves, foram identificados no teste bioquímico como *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* ou *Lactobacillus* sp., e na PCR foram detectados *L. reuteri* e *L. salivarius*. (Tab. 3).

Tabela 3. Identificação das espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío e cecos de aves, por meio do método bioquímico e pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Órgão	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	Método
Inglúvio	24a	59a	22a	21a	54a	Bioquímico
	0b	0b	104b	35b	0b	PCR
Ceco	18a	66a	26a	27a	49a	Bioquímico
	0b	0b	133b	17a	0b	PCR

Para cada órgão e cada espécie: valores seguidos de letras distintas na coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelos testes McNemar e qui-quadrado (Zar, 1996).

Lerche e Reuter (1962) isolaram *L. fermentum* e consideraram ser espécie dominante no intestino, sendo a mesma considerada como referência. Contudo, Kandler e Weiss (1986), por meio da homologia DNA-DNA, descreveram esse biótipo como uma nova espécie de *Lactobacillus* heterofermentativo, identificada como *L. reuteri*.

Dentre as estirpes de referência identificadas pelo kit bioquímico API 50 CHL, *L. reuteri* (CCT 3433) apresentou como resultado *L. fermentum* com 92,8% de confiabilidade, concordando com Chagnaud et al. (2001) que obtiveram resultado semelhante com a utilização do API 50 CHL para identificação de *L. reuteri*, sendo considerada como *L. fermentum* com (96,9%) de confiabilidade. Na PCR, entretanto, (Fig. 1) houve uma simples identificação dessa

estirpe como *L. reuteri*, mostrando que essas duas espécies não podem ser diferenciadas apenas pela fermentação de carboidratos. Das amostras isoladas do ingluvío e cecos de aves, e identificadas por meio do método bioquímico como *L. fermentum*, nenhuma foi positiva pela PCR.

Há dificuldades na distinção entre *L. reuteri* e *L. fermentum* pelos testes fisiológicos convencionais e métodos bioquímicos (Reuter, 1997), mesmo eles não sendo relacionados geneticamente, como indicado pela sua diferença no mol% de G+C do DNA (Kandler e Weiss, 1986). Klein et al. (1998) consideraram a característica molecular como ferramenta utilizada para diferenciar essas duas espécies.

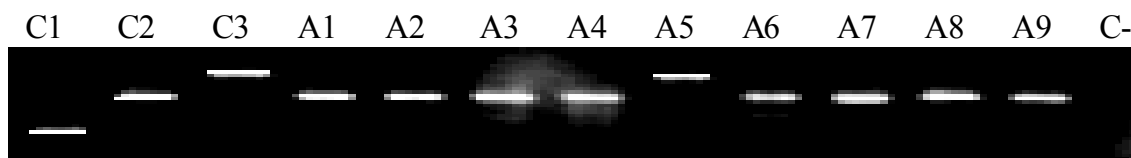


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR multiplex com iniciadores para *L. fermentum* (Fer3/Fer4), *L. reuteri* (Reu1/Reu2) e *L. salivarius* (Sal1/Sal2). Marcador de peso molecular 50pb. C1, C2 e C3: estirpes referência de *L. fermentum* CCT 3433 (192pb), *L. reuteri* CCT 3433 (303pb) e *L. salivarius* CCT 3752 (411pb), respectivamente. A1-A9: estirpes de isolados de aves (EIAs). C: controle negativo sem DNA.

Comparação entre método bioquímico...

O grupo *L. acidophilus* consiste de outras espécies como *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* e *L. jonsonii* identificadas por meio da análise de homologia de DNA-DNA (Johnson et al., 1980; Lauer et al., 1980; Fujisawa et al., 1992; Pot et al., 1993; Guan et al., 2003). Pelo método bioquímico, as amostras isoladas de aves foram positivas para *L. acidophilus* e, quando testadas na PCR para identificação do grupo e espécie, as mesmas apresentaram resultado negativo (Fig. 2).

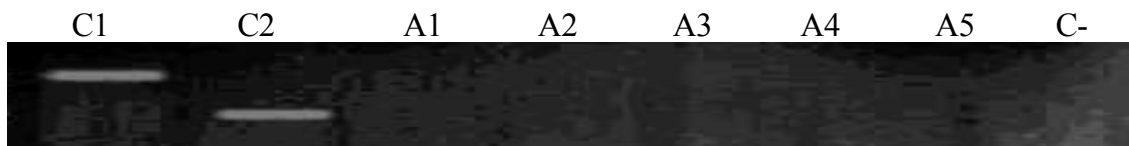


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR com iniciadores grupo-específicos (*LU-1/Lac2*) e iniciadores que amplificam segmento do genoma de *L. acidophilus* (*Lac1/23-10C*). Marcador de peso molecular 100pb. Colunas C1 e C2: estirpes-referência do grupo *Lactobacillus acidophilus* (300pb) e *L. acidophilus* KCTC 3111 (200pb), respectivamente. A1-A5: estirpes de isolados de aves (EIAs) negativo; C-: controle negativo sem DNA.

Considera-se importante identificar as espécies de *Lactobacillus* spp. presentes no ecossistema microbiano (Song et al., 2000), e são necessários métodos eficientes e simples para detectar e identificar as mesmas (Chagnaud et al., 2001). De acordo com Klaenhammer (1995), as espécies de maior incidência nos intestinos de humanos, suínos e galinhas são *L. salivarius* e *L. reuteri*. Segundo Garriga et al. (1998) *L. salivarius* é a espécie predominante no Inglúvio e conteúdo intestinal de galinhas jovens, enquanto *L. reuteri* é espécie heterofermentativa dominante no intestino de vacas (Sarraf et al., 1979).

A utilização da PCR na identificação das espécies de *Lactobacillus* isoladas de aves apresentou resultados discrepantes quando comparados com os resultados da fermentação de carboidratos, semelhante aos obtidos por Chagnaud et al. (2001), que, ao utilizarem o padrão de fermentação de carboidratos e PCR, verificaram que a PCR se mostrou mais discriminativa.

De Martinis (2002) considerou insatisfatória a utilização do padrão de fermentação de carboidratos como único critério para identificação das bactérias acidoláticas (LAB) porque ocorrem frequentemente variações nas fermentações, e a interpretação pode ser subjetiva.

Os iniciadores utilizados neste trabalho para identificação dos *Lactobacillus* foram estirpe-

específicos, com base na sequência do RNA ribossomal (rRNA) da região do espaço intergênico (ISR) do 16S e 23S, concordando com Stiles e Holzapfel (1997), que relataram o progresso das técnicas para estudos da relação fenotípica baseado nas análises de sequências do rRNA 16S e 23S, pois a informação genética dessas moléculas é altamente conservada e apropriada para determinar a relação das bactérias.

Os resultados obtidos por meio do multiplex PCR, considerado de fácil reprodutibilidade e rápido para identificação das amostras isoladas de aves, foram *L. reuteri* e *L. salivarius*, e assemelham-se ao observado por Klaenhammer (1995) ao verificarem, dentre as espécies de *Lactobacillus* em aves, que *L. reuteri* e *L. Salivarius* estavam presentes, identificadas por meio da homologia DNA-DNA.

CONCLUSÕES

A caracterização do gênero *Lactobacillus* pôde ser realizada com base nos testes de coloração pelo método de Gram, catalase, produção de gás em glicose e H₂S em TSI. A identificação das espécies de *Lactobacillus* é mais precisa e rápida com a utilização da PCR quando comparada com a identificação pela fermentação de carboidratos, que demonstrou ser subjetiva devido às variações na fermentação de carboidratos, principalmente na diferenciação das estirpes de *L. fermentum* e *L. reuteri*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), às biomédicas Suzane Ramos da Silva e Glenda Niciolli da Silva, pelo auxílio na execução dos métodos moleculares no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Botucatu, SP, e ao Prof. Dr. Josias Rodrigues do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAGNAUD, P.; MACHINIS, K.; COUTTE, L.A. et al. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods*, v.44, p.139-148, 2001.
- COLLINS, E.B.; HARTLEIN, K. Influences of temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks. *J. Dairy Sci.*, v.65, p.883-886, 1982.
- De MARTINIS, E.C.P. Identification of meat isolated bacteriocin-producing lactic acid bacteria using biotyping and ribotyping. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.659-661, 2002.
- FUJISAWA, T.; BENNO, Y.; YAESHIMA, T. et al. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* A3 (Johnson et al., 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.42, p.487-491, 1992.
- GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; MONFORT, J.M. et al. Selection of Lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.*, v.84, p.125-132, 1998.
- GUAN, L.L.; HAGEN, K.E.; TANNOCK, G.W. et al. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.6750-6757, 2003.
- JOHNSON, J.L.; PHELPS, C.F.; CUMMINS, C.S. et al. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.30, p.53-58, 1980.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: SNEATH, P.H.A.; MAIRM, N.S.; SHARPE, M.E. et al. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v.2, p.1209-1234.
- KANDLER, O.; STERTTER, K.O.; KÖHL, R. *Lactobacillus reuteri* sp. Nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig.*, C1, p.264-269, 1980.
- KAWAGUCHI, I.; HAYASHIDANI, H.; KANEKO, K. et al. Bacterial flora of the respiratory tracts in chickens with a particular reference to *Lactobacillus* species. *J. Vet. Med. Sci.*, v.54, p.261-267, 1991.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of intestinal lactobacilli. *Int. Dairy. J.*, v.5, p.1019-1058, 1995.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v.41, p.103-125, 1998.
- LAUER, E.; HELMING, C.; KANDLER, O. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig.*, C1, p.150-168, 1980.
- LERCHE, M.; REUTER, G. Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig.*, v.185, p.446-481, 1962.
- MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: ALTECH BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 1993, Florida. *Proceedings...* Florida, 1993. p.133-150.
- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Res. Microbiol.*, v.149, p.433-448, 1998.

- OLIVEIRA, D.E.; BACCHI, M.M.; MACARENCO, R.S.S. et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am. J. Clin Pathol.*, v.126, p.284-293, 2006.
- OYARZABAL, O.A.; CONNER, D.E. In vitro fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. *Poult. Sci.*, v.74, p.1418-1425, 1995.
- PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw Hill, 1981. p.1072.
- POT, B.; HERTEL, C.; LUDWIG, W. et al. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.*, v.139, p.513-517, 1993.
- REUTER, G. Was ist unter Doderlein-Bakterien zu verstehen? In: INTERNATIONALE TAGUNG UBER INFEKTIONEN IN DER GYNAKOLOGIE, GEBURTSHILFE UND UROLOGIE, 12., 1997, Munchen. *Proceedings...* Munchen, 1997.
- SALANITRO, J.P.; BLAKE, I.G.; MUIRHEAD, P.A. et al. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.35, p.782-790, 1978.
- SARRA, P.G.; MAGRI, M.; BOTTAZZI, V. et al. Frequenza di bacilli lattici eterofermentati nelle feci di vitelli lattanti. *Arch. Vet. Ital.*, v.30, p.16-21, 1979.
- SARRA, P.G.; MORELLI, L.; BOTTAZZI, V. The lactic acid microflora of fowl. In: WOOD, B.J.B. (Ed). *The lactic acid bacteria in health and diseases*. London: Elsevier, 1992. p.3-19.
- SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus*. In: _____. *The Prokaryotes*. Berlin: Springer Verlag, 1981. v.2, p.1653.
- SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. et al. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1239.
- SONG, Y.L.; KATO, N.; LIU, C.X. et al. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS. Microbiol. Lett.*, v.187, p.167-173, 2000.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, v.36, p.1-29, 1997.
- TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; DELLAGLIO, F. Use of PCR- Based Methods for Rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *L. Delbrueckii* subsp. *Lactis*. *J. Food Prot.*, v.65, p.4351-4356, 1999.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1996. p.718.