

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA *IN VITRO*  
DE *LACTOBACILLUS* SPP. COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO  
DE *SALMONELLA* HEIDELBERG

RAFAELA ALTARUGIO

Botucatu-SP, setembro de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA *IN VITRO*  
DE *LACTOBACILLUS* SPP. COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO  
DE *SALMONELLA* HEIDELBERG

RAFAELA ALTARUGIO

Defesa apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Altarugio, Rafaela.

Seleção e caracterização probiótica in vitro de  
Lactobacillus spp. com potencial de inibição de Salmonella  
Heidelberg / Rafaela Altarugio. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50503014

1. Peru (Ave). 2. Aves domésticas. 3. Salmonella  
Heidelberg. 4. Probiótico. 5. Lactobacillus.

Palavras-chave: Aves; Microbiota; Patógeno; Perus;  
Probiótico.

Data da Defesa: setembro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. Adriano Sakai Okamoto  
Presidente e Orientador  
Departamento de Clínica Médica Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Raphael Lucio Andreatti filho  
Membro  
Departamento de Clínica Médica Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

Dr. Guilherme Augusto Marietto Gonçalves  
Membro  
Autônomo  
DocBird – Consultoria em Medicina Aviária

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e a todos que acreditaram em meu potencial.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado força e discernimento para elaborar, executar e concluir este trabalho, aos meus pais Cleide Aparecida Bísparo e Edemur Altarugio por toda confiança depositada em mim, ao meu querido orientador Adriano Sakai Okamoto por acreditar no meu trabalho, me apoiar e ajudar em todos os momentos ao longo desses dois anos (minha gratidão será eterna), ao professor Raphael Lucio Andreatti Filho por todo incentivo, a Elisane Lenita Emilbradt pelas horas de ajuda nas análises, a Isamery Machado pela paciência e ajuda, a equipe do IBETEC-Botucatu por toda ajuda nas análises de sequenciamento de meu projeto, aos residentes do laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-Unesp/Botucatu e a agência FAPESP pelo auxílio de número 2015/00383-2.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1-** Testes de antagonismo das amostras de *Lactobacillus* spp. (L) contra *Salmonella* Heidelberg (SH), (A) *Spot on the Law*, (B) *radial streak*, (C) *ágar well diffusion*, (D) *liquid coculture assay* sem inibição da SH, (E) *liquid coculture assay* com inibição da SH, (F) *cross-streak* modificado.. .....34

**FIGURA 2-** Intensidade de amostras produtoras de Peróxido de Hidrogênio ..... 34

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	02
2.1. Produção Brasileira de carne de peru e <i>Salmonella</i> entérica .....	02
2.2. <i>Lactobacillus</i> spp. e sua caracterização como probiótico.....	03
2.3. Resistência bacteriana e o uso de antimicrobianos .....	06
<b>SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA IN VITRO DE <i>Lactobacillus</i> SPP. ISOLADOS DE PERUS</b> .....	15
<b>SUMMARY</b> .....	16
<b>DESCRIÇÃO DO PROBLEMA</b> .....	17
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i> .....	18
Identificação da espécie das amostras selecionadas .....	18
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i> .....	22
Caracterização probiótica.....	23
Identificação das espécies de amostras selecionadas.....	27
<b>CONCLUSÃO E APLICAÇÃO</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	33
<b>Tabela 1:</b> Resultados das amostras selecionadas em todas as análises realizadas. ....	33
<b>NORMAS DE ENVIO PARA JOURNAL OF APPLIED POULTRY RESEARCH</b> ...	34
<b>Apêndice Tabela 2.</b> Resultados da porcentagem (%) de inibição de crescimento dos isolados em presença de suco gástrico artificial e sais biliares em 3 horas de incubação, segundo técnica de Neumann (1991) e Walker e Gilliland (1993). ....	35
<b>Apêndice Tabela 3.</b> Resultados em centímetros do teste de antagonismo Spot on the Lawn contra <i>Salmonella</i> Heidelberg, segundo técnica de Santos (1993).....	36
<b>Apêndice Tabela 4.</b> Resultados do teste Radial Streak em centímetros com atividade inibidora do crescimento (AIC) segundo técnica adaptada de Bosch, et al., (2012).....	37

<b>Apêndice Tabela 5.</b> Resultados do teste ágar well diffusion em milímetros das zonas livres de crescimento (ZLC) segundo Mami et al., (2008).....	38
<b>Apêndice Tabela 6.</b> Resultados do teste liquid coculture assay da porcentagem de atividade inibitória das amostras contra a Salmonella Heidelberg segundo Coman, (2014). .....	39
<b>Apêndice Tabela 7.</b> Resultados do testecross-streak modificado das amostras contra Salmonella Heidelberg, segundo Verdenelli, et al., (2009).....	40
<b>Apêndice Tabela 8.</b> Resultados das médias e das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do teste de multiplicação in vitro de amostras com potencial probiótico no período de 3 horas. ....	41
<b>Apêndice Tabela 9.</b> Porcentagem (%) de hidrofobicidade das amostras e classificação das mesmas segundo Nader-Macias et al., (2008).....	42
<b>Apêndice Tabela 10.</b> Classificação do teste de produção de peróxido de hidrogênio segundo Silva, (2011). ....	43
<b>Apêndice Tabela 11.</b> Interpretação dos testes de antibiograma segundo Charteris, (1998). ....	44

# CAPITULO 1

Seleção e caracterização probiótica *in vitro*  
de *Lactobacillus* spp. com potencial de  
inibição de *Salmonella* Heidelberg

ALTARUGIO, R. **Seleção e caracterização probiótica *in vitro* de *Lactobacillus* spp. com potencial de inibição de *Salmonella* Heidelberg.** Botucatu-Sp, 2016, 45p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

**RESUMO:**

O presente trabalho teve como proposta realizar a caracterização probiótica *in vitro* de amostras de *Lactobacillus* spp., provenientes de conteúdo intestinal de perus adultos e saudáveis, através do isolamento e identificação por características morfológicas, moleculares e fisiológicas. Inicialmente foram isoladas 170 amostras, as quais foram avaliadas pelo método de coloração de gram, testes de produção de catalase, hidróxido de potássio, produção de gás através da fermentação da glicose e produção de gás sulfídrico em Triple Sugar Iron (TSI). Após foram pré-selecionadas 74 amostras, que passaram por identificação molecular com a Polymerase Chain Reaction (PCR) e submetidas ao PCR-ARDRA com uso das enzimas Sph I, Nco I, Nhe I, Ssp I, Sfu I, Dra I, Vsp I, Eco RI, Hinc II, Hind III e Avr II. A avaliação da resistência bacteriana ocorreu através dos testes de suco gástrico artificial e sua tolerância a sais biliares, capacidade de adesão à mucosa intestinal, potencial de multiplicação, provas de antagonismo contra *Salmonella* Heidelberg, produção de peróxido de hidrogênio, antibiograma e avaliação dos genes de resistência antimicrobianos integrons C e submetidas ao sequenciamento genético. Concluiu-se que 11 amostras foram selecionadas, sendo uma de *Lactobacillus frumenti*, 9 de *Lactobacillus reuteri* e uma de *Lactobacillus johnsonii*, todas com resultados nos testes de antagonismo, resistência ao suco gástrico, resistência a sais biliares, hidrofobicidade, potencial de multiplicação, produção de peróxido de hidrogênio e com resistência a mais de 50% dos antimicrobianos testados, porém não apresentaram genes de resistência antimicrobianos na técnica que avalia genes integrons C, baseado nos resultados de todas as análises as amostras selecionadas podem vir a ser administradas *in vivo*.

**Palavras-chaves:** aves, microbiota, patógeno, perus, probiótico, resistência.

**ALTARUGIO, R. Selection and characterization probiotic *Lactobacillus* spp. in vitro with *Salmonella* Heidelberg inhibition potential.** Botucatu-SP, 2016, 45p. Dissertation, (Master). School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

**ABSTRACT:**

The aim of the present work was to characterize the in vitro probiotic characterization of *Lactobacillus* spp. Samples from intestinal contents of adult and healthy turkeys through isolation and identification by morphological, molecular and physiological characteristics. Initially, 170 samples were isolated, which were evaluated by gram staining method, catalase production tests, potassium hydroxide, gas production through glucose fermentation and the production of sulphide gas in Triple Sugar Iron (TSI). After being pre-selected 74 samples, which were submitted to PCR-ARDRA using the enzymes Sph I, Nco I, Nhe I, Ssp I, Sfu I, Dra I, Vsp I, Eco RI, Hinc II, Hind III and Avr II. The evaluation of bacterial resistance occurred through the tests of artificial gastric juice and its tolerance to bile salts, intestinal mucosal adhesion capacity, multiplication potential, *Salmonella* Heidelberg antagonism tests, hydrogen peroxide production, antibiogram and evaluation of the genes of Antimicrobial resistance and submitted to genetic sequencing. It was concluded that 11 samples were selected, one of *Lactobacillus frumenti*, 9 of *Lactobacillus reuteri* and one of *Lactobacillus johnsonii*, all with results in the tests of antagonism, resistance to gastric juice, resistance to bile salts, hydrophobicity, multiplication potential, Hydrogen peroxide production and resistance to more than 50% of the antimicrobials tested, but did not present antimicrobial resistance genes in the technique that evaluates integron C genes, based on the results of all the analyzes the selected samples can be administered in vivo.

**Key-words:** birds, microbiota, pathogen, turkeys, probiotic, resistance.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Visando melhorias na produção avícola, a qual o Brasil ocupa posição de destaque mundialmente (ABPA, 2016), e a crescente preocupação com a resistência bacteriana a antimicrobianos que não são totalmente eficazes no combate a patógenos, reduzem a microbiota natural do trato gastrointestinal, aumentam a colonização do mesmo por micro-organismos (BERCHIERI JUNIOR e FREITAS, 2009, OIE, 2015), e por sua transferência de genes de resistência, que torna bactérias cada vez mais resistentes aos tratamentos medicamentosos existentes (MADIGAN, 2004), a indústria busca a introdução de modificações que aperfeiçoem os processos de criação, atendendo as exigências de consumidores preocupados com a qualidade do produto que consomem.

O uso de probióticos em substituição aos antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento, esta se tornando cada vez mais comum. Os probióticos são compostos por micro-organismos vivos os quais um dos principais gêneros é o *Lactobacillus*, pertencente ao filo *Firmicutes* (FELIS, DELLAGLIO, 2007), que age inibindo o crescimento de micro-organismos patogênicos, com o equilíbrio da microbiota intestinal e preservando a função da barreira epitelial, por meio da sua ação antagonista (LEBEER *et al.*, 2008), devido à secreção principalmente de ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, exercendo assim efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (FREITAS, RABELO, WATANABE, 2014).

As características benéficas de um probiótico necessitam da observação do comportamento específico de cada linhagem de bactéria, em que são propostos critérios funcionais, de segurança e tecnológicos para a seleção de novas linhagens para agirem contra patógenos.

As bactérias do gênero *Salmonella* atualmente representam um desses patógenos (BOYLE *et al.*, 2007), pois possuem uma alta capacidade de penetrar em diferentes tipos celulares, incluindo as células do trato intestinal das aves, sendo excretada nas fezes e podendo entrar na cadeia alimentar humana (ANDREATTI FILHO, 2007), levando a prejuízos tanto na produção comercial quanto na saúde pública. A *Salmonella* entérica sorotipo Heidelberg é considerado um dos patógenos emergentes mais isolados de produtos avícolas e/ou surtos alimentares em diversas regiões (VELGE, CLOECKAERT, BARROW, 2005).

Devido à escassez no mercado de produtos probióticos voltados a criação de perus, que esta em franca expansão, o presente trabalho identificou cepas de *Lactobacillus* spp. presentes em conteúdo intestinal de perus, através de características morfológicas, moleculares e fisiológicas selecionando as melhores cepas com potencial probiótico frente aos testes de caracterização probiótica para possível uso em *in vivo*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Produção Brasileira de carne de peru e *Salmonella* entérica**

A produção brasileira de carne de peru no ano de 2015 ficou em 327.179 mil toneladas, das quais 41% destinaram-se as exportações e 59% para o mercado interno. As exportações de carne de peru totalizaram 133 mil toneladas, sendo 62,77% de cortes, 37,18% de produtos industrializados e 0,05% de inteiros (ABPA, 2016).

A *Salmonella* é um dos mais importantes patógenos transmitidos por alimentos (BOYLE *et al.*, 2007). São conhecidos mais de 2500 sorovares de *Salmonellas*, porém apenas 10% foram isolados de aves, uma vez que a distribuição dos sorovares de fontes avícolas é variável geograficamente, alterando se com o passar dos anos (GAST *et al.*, 2007).

A *Salmonellas* não tifóides por não serem específicas das aves tem a capacidade de colonizar o trato intestinal das mesmas sem causar sinais clínicos, e assim oferecem risco para a saúde pública uma vez que aumentam a contaminação da carcaça e dos ovos (ANDREATTI FILHO, 2007).

Na epidemiologia da doença humana há predomínio de poucos sorovares, alguns se mantendo disseminados em estágio contínuo, ou se apresentando como emergentes, como a *Salmonella* Heidelberg (VELGE, CLOECKAERT, BARROW, 2005). Esta é identificada em aves e produtos derivados em nosso país desde 1962 (HOFER, SILVA FILHO, REIS, 1997). Este patógeno é considerado um sorovar mais invasivo que outros sorovares não tifóides causando quadros de doenças mais graves em humanos (PHAC, 2007).

O isolamento de *Salmonella* entérica de aves e seus subprodutos são maiores quando comparados a outras espécies de animais de produção. O número crescente de comercialização de galinhas e perus, e os rigorosos programas de vigilância

desenvolvidos para identificar plânteis e produtos positivos são fatores responsáveis pela alta taxa de detecção do patógeno (GAST, 2003).

No Brasil um estudo de prevalência de *Salmonella* entérica em isolados de aves e seus produtos durante o período de 1962 a 1991 identificou o aparecimento da *S. Heidelberg* (HOFER, SILVA FILHO, REIS, 1997). Nascimento *et al.*, (1997) isolou este sorovar em cortes e carcaça de frango identificando-os como 11% de *S. Heidelberg*, 26% *S. Hadar* e 51% *S. Enteritidis*.

Segundo Dickel (2004) que avaliou processos higiênicos e sanitários de frangos em matadouros no sul do Brasil, foi identificado em carcaças antes e depois do *chiller* que a *S. Heidelberg* estava presente em 63,9% dos isolados, seguida pela *S. Enteritidis* com 31,9% e *S. Worthington* e *S. Tennessee* ambas com 2,1%.

No período de 2000 a 2006 um estudo conduzido em 14 Estados do país, num total de 2.710 unidades amostrais de frango analisadas, mostrou que em relação à *Salmonella* entérica, foi encontrada uma prevalência média de 3,03%, um total de 250 cepas foram submetidas à análise de caracterização antigênica, das quais 18 sorovares foram isolados, estando a *Salmonella Heidelberg* entre as mais isoladas, com 6,4% (ANVISA, 2012).

No Canadá a *Salmonella Heidelberg* está entre os três sorovares mais isolados de frangos (PHAC, 2014). Os laboratórios credenciados como o Laboratório Nacional de Microbiologia do Canadá, através PulseNet Canadá (uma rede eletrônica virtual que liga os laboratórios de saúde pública), rastreando o DNA de agentes patogênicos em surtos de origem alimentar humana, relataram que os casos de salmoneloses aumentaram de 20% em 2006 para 48% em 2010 (PHAC, 2012).

Nos Estados Unidos em 2011 a empresa Cargill fez *recall* de 16,3 milhões de quilos de carne de peru moída contaminados com *Salmonella Heidelberg* (EXAME, 2011). Em 2013 a *Foster Farms* detectou *Salmonella Heidelberg* em grande quantidade de carne de frango crua fornecidas pela empresa, este surto atingiu 18 estados nos Estados Unidos e 278 pessoas adoeceram (G1, 2013).

## **2.2 *Lactobacillus* spp. e sua caracterização como probiótico**

Os probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro (FULLER, 1989). O

*Lactobacillus* é um dos principais gêneros utilizados, sendo o lactato o principal resíduo produzido, este reduz as taxas de infecções, modula a microbiota intestinal e preserva as mucosas de injúrias por micro-organismos patogênicos (COLLINS *et al.*, 2009).

O *Lactobacilli* são bactérias gram positivas, desta forma se encaixam nas características das eubactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae* (FELIS, DELLAGLIO, 2007).

Dentre as abordagens moleculares para identificação de gêneros como o *Lactobacillus*, esta a técnica de análise de restrição do DNA ribossômico amplificado conhecido como ARDRA, que se utiliza das características dos operons ribossomais (*rrn*). Esta técnica é uma das mais recomendadas na determinação de espécies do gênero *Lactobacillus* (TEIXEIRA e REIS, 2004).

Segundo Lebeer *et al.* (2008), para se caracterizar um probiótico este deve se enquadrar ao menos em uma das seguintes categorias: manter a homeostase da microbiota e inibir a proliferação de patógeno através das interações bactéria-bactéria; promover a função de barreira epitelial e modular a resposta imune.

As bactérias probióticas são anaeróbias facultativas ou microaerófilas, sendo classificadas como homofermentativas quando transformam o produto final da fermentação da lactose em ácido lático, ou heterofermentativas transformando em etanol, dióxido de carbono e acetato (MICHAIL, WEI, MACK, 1997).

Segundo Butolo (1999), nos produtos comerciais probióticos disponíveis para animais como aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães e gatos as espécies de *Lactobacillus* mais utilizadas são o *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri* e *L. johonsii*. Onde estes micro-organismos não patogênicos, são derivados de microbiota normal de indivíduos da espécie animal que o produto for destinado (FULLER e COLE 1988).

O probiótico também age por antagonismo direto produzindo bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio tendo ação antibacteriana (FREITAS, RABELO, WATANABE, 2014). Através do forte efeito oxidante nas células bacterianas o peróxido de hidrogênio produzido inibe o crescimento de patógenos inibindo certas bactérias anaeróbias ou agindo na destruição molecular da estrutura básica dos ácidos nucléicos e proteínas celulares (PRICE, LEE, 1970, GILLILAND, SPECK, 1972).

A preservação da função de barreira epitelial é outro mecanismo associado ao efeito probiótico, ocorrendo por exclusão competitiva entre as linhagens patogênicas e

os probióticos pelos mesmos sítios de adesão nas mucosas ou por nutrientes (PRETZER *et al.*, 2005).

As bactérias probióticas como o *Lactobacillus* também são capazes de manter a integridade da barreira epitelial e reduzir a permeabilidade das mucosas, estimulando a adesão célula-célula (SETH *et al.*, 2008) induzindo a produção de mucinas (glicoproteínas) (MACK *et al.*, 2003) e prevenindo a apoptose pelas células intestinais (FANG *et al.*, 2007).

A adesão bacteriana depende em parte de interações reversíveis que são mediadas por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e cargas, que não são consideradas específicas, mas propriedades importantes, ou interações irreversíveis. Estudos demonstram que a presença de glicoproteínas na superfície celular, resultará em alta hidrofobicidade e que a baixa hidrofobicidade está associada à presença de polissacarídeos (PELLETIER, *et al.*, 1997).

Quando a microbiota já está estabelecida, a administração de probióticos nas mucosas pode induzir diferentes tipos de respostas humorais como a inata e a adaptativa. Estas respostas ocorrem em três vias, pois os probióticos não apresentam fatores de patogenicidade e virulência, a primeira via ocorre através das zônulas de oclusão, a segunda pela transcitose e terceira pela fagocitose direta pelas células dendríticas (LEBEER *et al.*, 2008).

Para promover os efeitos benéficos o probiótico deve resistir e manter a viabilidade sob as condições adversas ou desafios impostos pelo organismo do hospedeiro. Nas aves como frangos e perus o tempo de trânsito intestinal pelo trato digestório é medido com o uso de marcadores, ou pelo tempo de passagem pelo trato de substâncias não absorvíveis e não digeríveis, de forma geral nessas aves os marcadores aparecem nas fezes de 2 a 3 horas após a ingestão. Porém o trânsito intestinal pode ser influenciado por fatores como consistência, tamanho e estado do alimento entre outros (MACARI, MARTINHO, PARKER, 2002).

O primeiro destes desafios é o suco gástrico, que contém as enzimas gástricas digestivas que funcionam em um pH extremamente baixo. Muitas bactérias não sobrevivem bem em pH ácido (JIN *et al.*, 1998).

Nas aves este pH pode variar, sendo que na região do proventrículo apresentam dois tipos de glândulas, a mucosa simples, que secreta muco espesso, e as compostas que são semelhantes as células principais, pois não há células parietais que secretam pepsinogênio, muco e ácido clorídrico (MACARI, MARTINHO, PARKER, 2002).

Quando estimuladas ao máximo as glândulas compostas secretam ácido clorídrico (HCl) com um pH de 1 a 2 (FARNER, 1960). Estas também são responsáveis por secretarem pepsina, como pro-enzimas inativas denominadas pepsinogênio que são estocados sobre a forma de grânulos até serem secretados no lúmen (MACARI, MARTINHO, PARKER, 2002).

Em perus existe uma relação entre o conteúdo proteico de uma dieta e a taxa de secreção do suco gástrico, mostrando que há uma fase gástrica no controle das secreções. No entanto quando o alimento ingerido alcança o proventrículo este estimula a secreção gástrica (fase gástrica ou mecânica). O pH do suco gástrico varia de 0,5 a 3,0, onde a manutenção do pH em torno de 2 é ideal para transformação de pepsinogênio em pepsina. Já no intestino delgado o suco entérico das aves é em torno de pH 8, sendo que as enzimas pancreáticas e intestinais, possuem uma atividade digestiva primariamente no intestino delgado, com uma ótima taxa de atividade na faixa de pH entre 6 a 8 (MACARI, MARTINHO, PARKER, 2002).

Além de ter que tolerar o pH ácido no estômago, os probióticos têm como desafio os sais biliares intestinais. Os sais biliares representam moléculas com atividade antimicrobiana, rompendo membranas biológicas (LEEGER *et al.*, 2008). São propriedades importantes de um probiótico à persistência e multiplicação, que proporcionam a implantação do mesmo, essencial para que a microbiota seja modificada em sua composição ou atividade. O probiótico deve competir com a microbiota presente pelos nutrientes necessários e encontrar condições favoráveis para que haja sua multiplicação (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

Segundo Silva e Andreatti Filho (2000), produtos probióticos e prebióticos, não determinam resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos. Esta resistência representa do ponto de vista clínico e de saúde pública, um sério problema (MANIE, 1997).

### **2.3. Resistência bacteriana e o uso de antimicrobianos**

A resistência bacteriana aos antibióticos também tem despertado o interesse da comunidade científica para o uso profilático e terapêutico de probióticos (TAMBEKAR e BHUTADA 2010).

A extensa aplicação dos antimicrobianos em pequenas doses para controlar doenças e melhorar o desempenho dos animais de produção (AKINELEY, 2008)

tornou-se um importante fator no surgimento da resistência bacteriana, que pode ser transferida para os seres humanos através do consumo dos produtos animais (TOLLEFSON *et al.*, 1997).

A resistência às drogas antimicrobianas é definida como a capacidade que um organismo adquire de resistir a um agente quimioterápico ao qual esta susceptível, e os genes de resistência são transferidos por meio de trocas genéticas a outros microorganismos. O uso de muitas drogas antimicrobianas de forma extensiva esta proporcionando o desenvolvimento de resistência especifica as drogas nos microorganismos causadores de doenças, em decorrência disto deve se submeter às bactérias isoladas de espécimes clínicos aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos como a difusão em ágar (MADIGAN, 2004). Para um organismo ser considerado como bom probiótico este não pode ser capaz de transmitir genes de resistência a outros microorganismos (SANTOS *et al.*, 2003).

O aumento da resistência antimicrobiana, observada em uma população bacteriana, pode resultar da seleção clonal de organismos que toleram doses baixas de antimicrobianos e que apresentam maior aptidão sobre condições de seleção, ou a partir da disseminação de resistência através da transferência horizontal de genes. A hipótese mais plausível é de que, no ambiente natural, ambos os mecanismos são responsáveis para a dinâmica da população bacteriana (REINTHALER *et al.*, 2003, TENNSTEDT *et al.*, 2003). As regiões variáveis da classe 1 de integrons, estão associadas à resistência aos antibióticos (SILVA *et al.*, 2006).

Segundo dados da OIE, 2015 os agentes antimicrobianos reduzem a microbiota do trato gastrointestinal e aumentam a colonização por *Salmonella* spp. O tratamento para este patógeno pode ser realizado com estas drogas, reduzindo perdas por mortalidade, porém não impedem que a ave permaneça portadora e eliminem o patógeno por nas fezes por um período maior do que as aves sem tratamento, mostrando que não são totalmente eficazes (BERCHIERI JUNIOR e FREITAS, 2009).

### 3. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), 1º ed., 171pgs, 2012.

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo:Roca, p.96-111, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL 2016. Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/storage/files/versão\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versão_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)> Acessado em 18 de julho, 2016.

AKINLEYE, S.B., IYAYI, E.A., AFOLABI, K.D. The Performance, Haemaology and carcass tait of broilers as affected by diets supplemented with or without biomin a natural growth promoter. **W. J. Agr. Sci.**, v.4, n.4, p467-470, 2008.

BERCHIERI, A.J, FREITAS, O.C.N. Salmoneloses. **Doença das aves**. Campinas, Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Aviária, 2ª ed., p.435-451, 2009.

BOYLE, E. C., JENNIFER L. BISHOP, GUNTRAM A. GRASSL, B. BRETT FINLAY. *Salmonella*: From pathogenesis to therapeutics. **J. Bacteriol.**, ed.5, v.189, p.1489–1495. 2007.

BUTOLO, J.E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. Simpósio sobre as implicações socioeconômicas do uso de aditivos na nutrição animal, 1999, PIRACICABA. ANAIS... PIRACICABA: CBNA, p. 85-94, 1999.

COLLINS J.W., LA RAGIONE R. M., WOODWARD M. J., SEARLE L. E. JApplication of Prebiotics and Probiotics in Livestock. In: Charalampopoulos D., Rastall R. A. (ed.), **Prebiotics and probiotics science and technology**. Springer, New York, NY, p.1123-1192, 2009.

DICKEL, E. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; VALLE, S. F; CECATTI, D. Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente

automatizada (grande porte), semi automatizada (médio porte) e semi automatizada (pequeno porte). **Higiene Alimentar**, v.19, n.131, p. 62-67, 2005.

**EXAME**. Cargill faz recall de perus nos Estados Unidos. Disponível em:<<http://exame.abril.com.br/negocios/noticias/cargill-faz-recall-de-perus-nos-estados-unidos>>. Acessado em 20 de março de 2016.

FANG, Y., HANWEI, C., TIMOTHY, L. C., ROBERT, W., WASHINGTON, M.K., POLK, D.B. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. **Gastroenterol.** v. 132, p.562-575, 2007.

FARNER, D.S. Digestion and digestive system. In: Biology and comparative physiology of birds. **A.J Marshall.**, v.1, 411-468, 1960.

FELIS, G.E., DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Curr. IssuesIntest. Microbiol.** v. 8, p. 44-61, 2007.

FULLER , R. Probiotics in man and animals: a review. **J. of Appl. Bacteriol.** v.66, p. 365-378, 1989.

FULLER , R., COLE, E.C.B. The scientific basis of the probiotic concepts. In: Probiotics - Theory and Applications. STARK, B.A; WILKINSON, J.M. (Ed). **Chalcombe Public.** p.1-14, 1988.

FREITAS, E.D, RABELLO, C.B.V, WATANABE, P.H. Nutrição de não ruminantes. **FUNEP**, Jaboticabal, p.487-496, 2014.

GAST, R., GURAYA, R., GUARD-BOULDIN, J. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Dis.**, v.51, p.40-44, 2007.

GAST, R.K. Salmonella infections. In: SAIF, Y. M., BARNES, H. J., GLISSON, J. R., FADLY, A. M., MCDOUGALD, L. R., SWAYNE, D. E. (Org.) **Diseases of Poultry.** 11º ed., p.567-613, 2003.

GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Interactions of food starter cultures and food borne pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. **J. Milk Food Technol.**, v. 35, p 307-310, 1972.

**G1.** Frango provoca surto de infecção por *Salmonella* nos Estados Unidos. Disponível em: < <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2013/10/frango-provoca-surto-de-infeccao-por-salmonela-nos-estados-unidos.html>>. Acessado em: 20 de março em 2016.

HOFER, E., SILVA FILHO, S.J., REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq.Vet. Bras.**, v. 17, p.55-62, 1997.

JIN, L.Z, HO,Y.W, ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 183-185, 1998.

REIS, F. B. J., TEIXEIRA, K. R. S., REIS, V. M. Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria*. **Documentos: EMBRAPA Cerrados**, Planaltina, v. 117, p. 1 - 41, 2004.

LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, v. 72, n. 4, p. 728, 2008.

MACARI, M., FURLAN, R.L., GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, 2º ed., p.101-108, 2002.

MACK, D.R., AHRNE, S., HYDE, L., WEI, S., HOLLINGSWORTH, M.A. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**. v. 52, p.827-833, 2003.

MADIGAN, M.T, MARTINKO, J.M, PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Pearson Education, Brasil, 10º ed., p.546-553, 2004.

MANIE,T., KHAN, S., BRÖZEL, V.S, VEITH, W.J, GOUWS, P.A. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in south Africa. **Letters in Ap. Microbiol.**, v. 26, p. 253- 258, 1998.

MICHAIL, S., WEI, S. MACK, D.R. *Escherichia coli* strain 2348/69 in vitro adhesion is reduced in the presence of a *Lactobacillus* species. **Gastroenterol.**, v. 112, p.1042, 1997.

NASCIMENTO, V.P., OLIVEIRA, J.D., RIBEIRO, A.R., SANTOS, L.R., CARDOSO, M.O., PONTES, A.P., SILVA, A.B., ROCHA, S.L.S. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frango. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1997, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: 1997. p.287.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL.** Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por salmonela. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_prevent\\_salmonella.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf)>. Acessado em 01 de Agosto de 2016.

PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA,C., BOUTTIER,S., BOURLIOUX,P., BELLON-FONTAINE, M.N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, 1997.

**PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA 2007.** *Salmonella* Heidelberg – Ceftiofur-Related Resistance in Human and Retail Chicken Isolates. Disponível em: <<http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/heidelberg-eng.php>> Acessado em 20 de fevereiro, 2016.

**PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA 2012.** Evaluation of food-borne Illness Prevention, Detectin and Response Activities at the Public Health Agency. Disponível em:<[http://www.phac-aspc.gc.ca/about\\_apropos/evaluation/reports-rapports/2011-2012/feipdra-pdimeoa/findings-resultats-eng.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/about_apropos/evaluation/reports-rapports/2011-2012/feipdra-pdimeoa/findings-resultats-eng.php)> Acessado em 20 de fevereiro, 2016.

PRETZER, G., SNEL,J., MOLENAAR D., WIERSMA,A, BRON,P. A1, LAMBERT,J., M. DE VOS,W., MEER R., SMITS,A.M, KLEEREBEZEM M. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. **J. Bacteriol.** v. 187, p.6128-6136, 2005.

PRICE, R.J., LEE, J.S. Inhibition of Pseudomonos species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **Milk Food Tech.**, v. 33, p.13-18, 1970.

REINTHALER, F.F, POSCH, J., FEIERL, G., WUST, G., HAAS, D., RUCKENBAUER, G., MASCHER, F., MARTH, E. Antibiotic resistance of E. Coliin sewage and sludge.**Water** v.37, p.1685-1690, 2003.

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 Agrotécnica**, v.27, n.6, p. 1394-1400, 2003.

SETH, A., YAN F., POLK D.B, RAO R.K. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 294, p. 1060-1069, 2008.

SILVA, E.N., ANDREATTI FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II Simpósio de sanidade avícola, 2000, Santa Maria. **Anais...Concórdia**. EMBRAPA Suínos e aves, 2000. v. 1, p.45-55.

SILVA, M.F, VAZ-MOREIRA, I., GONZALEZ-PAJUELO,M., NUNES, O.C, MANAIA, C.M. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from na urban waste water treatment plant. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 1, p1-11, 2006.

TAMBEKAR, D.H., BHUTADA, S.A. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk o domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. **Recent Res. Sci. Technol.**, v.2, 82-88, 2010.

TENNSTEDT, T., R. SZCZEPANOWSKI, S. BRAUN, A. PUHLER, A. SCHLUTER. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. **FEMS Microbiol.**, v. 45, p. 239-252, 2003.

TOLLEFSON, L., ALTEKRUSES, S.F., POTTER, M.E. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. **Rev. Scient. Tech.**, v.16, n.2, p. 709-715, 1997.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. **Os Probióticos e a Saúde Infantil**, v. 1, Brasil: Nestlé Ltda., p. 3-11, 2000.

VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Vet. Res.** v. 36, p. 267-288, 2005.

# CAPITULO 2

Seleção e caracterização probiótica *in vitro*  
de *Lactobacillus* spp. isolados de perus

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA *IN VITRO* DE *Lactobacillus*  
SPP. ISOLADOS DE PERUS**

**R. Altarugio<sup>\*</sup>, IV Bastos<sup>\*</sup>, ACI Moraes<sup>\*</sup>, E. L. Milbradt<sup>\*</sup>, R.L. Andreatti Filho<sup>\*</sup>,  
P.T.C.G.Okamoto<sup>\*</sup>, A.S. Okamoto<sup>\*</sup>**

*<sup>\*</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório de Ornitopatologiae e Clínica Veterinária FMVZ  
/UNESP Botucatu – SP/Brasil*

Trabalho a ser enviado a revista Internacional Journal of Applied Poultry Research

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA IN VITRO DE *Lactobacillus* SPP.  
ISOLADOS DE PERUS

R. Altarugio<sup>\*1</sup>, IV Bastos<sup>\*</sup>, ACI Moraes<sup>\*</sup>, E. L. Emilbradt<sup>\*</sup>, R.L. Andreatti Filho<sup>\*</sup>,  
P.T.C.G.Okamoto<sup>o</sup>, A.S. Okamoto<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório de Ornitopatologia e Clínica Veterinária FMVZ  
/UNESP Botucatu – SP/Brasil

---

**Primary audience:** quality assurance personnel, scientific section and diseases.

---

### SUMMARY

A saúde das aves está intimamente relacionada à forma como são criadas, sendo a microbiota intestinal parte fundamental no pleno desenvolvimento de seu potencial produtivo. Os *Lactobacillus* spp. são bactérias que fazem parte da microbiota natural das aves e comumente são utilizados como probióticos, para isso devem apresentar várias características. O presente experimento teve como proposta realizar o isolamento e a caracterização probiótica *in vitro* de amostras de *Lactobacillus* spp., provenientes de conteúdo intestinal de perus saudáveis através do isolamento e identificação por características morfológicas, moleculares e fisiológicas. As amostras isoladas foram identificadas pelo método de coloração de gram, testes de produção de catalase, hidróxido de potássio, produção de gás através da fermentação da glicose e produção de gás sulfídrico em Triple Sugar Iron. Após passaram por identificação molecular através da *Polymerase Chain Reaction* e sequenciamento genético. A avaliação do potencial probiótico ocorreu através dos testes de suco gástrico artificial e sais biliares, capacidade de adesão à mucosa intestinal, potencial de multiplicação, provas de antagonismo contra *Salmonella* Heidelberg, produção de peróxido de hidrogênio, antibiograma e avaliação dos genes de resistência aos antimicrobianos *integrons* C. Concluiu-se que foi possível a identificação e seleção de algumas amostras bacterianas, as quais demonstraram potencial em relação às características probióticas, sendo possíveis candidatas para inclusão em um produto probiótico de uso *in vivo*.

**Palavras chaves:** aves, microbiota, probiótico, patógeno, resistência.

---

<sup>1</sup>Corresponding author: [rafaelaaltarugio@hotmail.com](mailto:rafaelaaltarugio@hotmail.com)

•FAPESP auxílio n° 2015/00383-2

## DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

A *Salmonella* esta entre os mais importantes patógenos transmitidos por alimentos [1]. São conhecidos mais de 2500 sorovares de *Salmonella* spp., porém apenas 10% foram isolados de aves, uma vez que a distribuição dos sorovares de fontes avícolas é variável geograficamente, alterando-se com o passar dos anos [2]. Sorovares não tifóides por não serem específicos das aves tem a capacidade de colonizar o trato intestinal das mesmas sem causar sinais clínicos, e assim oferecem risco para a saúde pública uma vez que podem contaminar as carcaças e ovos de consumo [3].

Na epidemiologia da doença humana há predomínio de poucos sorovares, alguns se mantendo disseminados em estágio contínuo, ou se apresentando como emergentes, como a *Salmonella* Heidelberg [4]. Este patógeno é considerado o sorovar mais invasivo que outros sorovares não tifóides, causando quadros de doenças mais graves em humanos [5]. A resistência bacteriana aos antibióticos também tem despertado o interesse da comunidade científica para o uso profilático e terapêutico de probióticos [6].

Os probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro [7]. Os *Lactobacillus* spp. são um dos principais gêneros representantes, sendo o lactato o principal resíduo produzido, este reduz as taxas de infecções, modula a microbiota intestinal e preserva as mucosas de injúrias por micro-organismos patogênicos [8].

Segundo [9], para se caracterizar um probiótico este deve se enquadrar ao menos em uma das seguintes categorias: manter a homeostase da microbiota e inibir a proliferação de patógeno através das interações micróbio-micróbio, promover a função de barreira epitelial e modular a resposta imune.

No setor avícola a produção de perus no Brasil ocupa grande destaque no mercado mundial, segundo relatório [10] no ano de 2012 o país ocupou o segundo lugar em exportações e em 2013 o terceiro lugar como produtor.

Devido à escassez no mercado de produtos probióticos voltados para criação de perus, o presente experimento identificou cepas de *Lactobacillus* spp. através de características morfológicas, moleculares e fisiológicas, selecionando as cepas com potencial probiótico frente aos testes de caracterização probiótica para possível uso *in vivo*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Identificação do gênero Lactobacillus*

Após deslocamento cervical de 150 perus adultos saudáveis da linhagem British United Turkeys of America (BUTA) provenientes de criações comerciais, os cecos foram coletados de forma asséptica, armazenados em embalagens plásticas individuais e identificados, sob refrigeração. Todo conteúdo do ceco foi transferido para tubos contendo 10 ml de caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS) estéreis e incubados a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Após a incubação o caldo MRS foi semeado em ágar MRS, e incubado nas mesmas condições. A identificação baseou-se nas características morfológicas e fisiológicas em que se utilizaram os testes de produção de catalase, hidróxido de potássio, produção de gás através da fermentação da glicose, coloração de gram e produção de gás sulfídrico em *Triple Sugar Iron* (TSI) de acordo com [11].

Após prévia identificação o DNA foi obtido através do uso de *kit* de extração [12], as amostras passaram por identificação molecular com a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em que foram utilizados os seguintes pares de *primers* para região conservada do gene 16S: *Forw* R16-1 5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA- 3' e *Rev* LbLMA1- 5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC -3' visando a amplificação de um produto de aproximadamente 250 pb [13].

Cada reação de 25 µl foi composta por 2,5 µL de cada *primer* na concentração de 20 pmol, 12,5µL de [14], 2,5 µL de água ultra pura e 5 µL de DNA . O programa de amplificação realizado foi iniciado com: 95°C por 5 min, seguidos de 20 ciclos à 95°C durante 30 s (desnaturação), 55°C por 30 s e 72°C por 30 s (anelamento), e sete min a 72°C (extensão final) [15]. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4% e corados [16], visualizados em transiluminador de luz ultravioleta [17].

### *Caracterização probiótica*

O teste de resistência ao suco gástrico *in vitro* foi realizado de acordo com [18], em que as culturas de *Lactobacillus* spp. em fase estacionária com incubação prévia em caldo MRS à 37°C por 18 horas foram diluídas 10x em uma solução salina (0,9% de NaCl) com pH 7,0 (controle), e em suco gástrico artificial (2g.L<sup>-1</sup> NaCl, pepsina 3,2 g.L<sup>-1</sup>

com pH 2,5) (teste), incubadas a 37°C durante 3 horas, após foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto [19] e suspendidas em caldo MRS, alíquotadas em microplacas e incubadas durante a 37°C com 200 µL/poço dos inoculo do controle e das colônias tratadas com suco gástrico artificial. A densidade óptica (OD) no espectro de 620 nm foi avaliada durante 10 horas a cada 30 minutos na [20]. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula  $(1-ASG/ACT) \times 100$ , onde ASG significa a absorbância da amostra com o suco gástrico artificial e ACT significa a absorbância da amostra controle.

O teste de tolerância a sais biliares *in vitro* foi realizado de acordo com [21], em que as amostras de *Lactobacillus* spp. cultivadas em caldo MRS a 37°C por 24 horas foram inoculadas (2% v/v) em caldo MRS (controle) e caldo MRS com Oxgall (0,3% v/v) (teste) e incubadas a 37°C por 3 horas. As leituras espectrofotométricas e a porcentagem de inibição foram realizadas da mesma forma que o teste de resistência ao suco gástrico artificial.

O potencial de multiplicação das amostras de *Lactobacillus* spp. foi avaliado mediante cultivo em caldo MRS a 37°C e posterior contagem em ágar MRS, onde uma alíquota de 0,1 mL da amostra diluída em 0,9 mL de *phosphate buffered saline* (PBS) [22] foi coletada, obtendo assim a primeira diluição ( $10^{-1}$ ), da qual obtivemos mais 8 diluições seriadas (1:10). De todas as diluições foram retirados 0,1 mL e repassados para placas de ágar MRS, em duplicata, para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), após cultivo de 24 horas a 37°C. O caldo inicial foi incubado e realizada a contagem no momento de 0 horas, este foi incubado novamente a 37°C, repetindo as contagens de UFC nos momentos 3, 6, 9, 14 e 18 horas após a primeira contagem (momento 0).

A hidrofobicidade da superfície celular foi avaliada conforme metodologia de [23], em que culturas de *Lactobacillus* spp. em fase estacionária foram lavadas duas vezes com PBS e ajustadas para uma  $OD_{400nm}$  [20] de 0,4 com 0,1M de  $KNO_3$ , pH 6.2 ( $A_0$ ). Um volume 0,2 mL de hexadecane foi adicionado a uma suspensão de 1,2 mL de *Lactobacillus* spp. e após 10 minutos de pré-incubação a temperatura ambiente, à amostra foi homogeneizada em vortex por 2 minutos. A fase aquosa foi removida após 15 minutos e sua  $OD_{400nm}$  [20] medida ( $A_1$ ). A porcentagem de adesão microbiana aos solventes foi calculada por  $(1-A_1/A_0) \times 100$ . Os isolados foram classificados de acordo com sua porcentagem em alta hidrofobicidade (66,67 a 100%), média (33,37 a 66,66%) e baixa (0 a 33,33%) de acordo com [24].

A síntese de peróxido de hidrogênio foi avaliada com o método colorimétrico segundo [25], em que isolados em fase estacionária foram inoculados em placas contendo meio TMB-plus, (Tetrametil Benzidina Dihidroclorito 0,25g, *Brucella Ágar* 43,0g, Amido 20,0g, 10 ml de solução de hemina 0,05%, MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,12g, MgSO<sub>4</sub> 0,57g, 10 ml de solução de peroxidase 0,1%, 50 ml de soro de cavalo, em 1L de água destilada) mantidos por 18 horas a 37°C em anaerobiose e posteriormente expostas ao ar durante 30 minutos. Devido à atividade oxidante da substância produzida os isolados foram classificados como produtores de peróxido de hidrogênio se o inóculo adquiriu tons azul ou marrom.

O antibiograma foi adaptado de [26-27]. As amostras foram cultivadas em 5 mL de caldo MRS à 37°C durante 48 horas, após foram passados um mL desta cultura para novo caldo MRS e incubados a 37°C até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Foram utilizadas placas de petri com ágar MRS que receberam caldo MRS acrescido de 0,65% de ágar ágar com 800 µl do inóculo de cada amostra. Para solidificação foram deixadas em temperatura ambiente. Após a completa secagem da superfície do ágar, com auxílio de uma pinça estéril, foram colocados os discos de antibióticos [28] gentamicina 10 µg, bacitracina 10 µg, sulfato de colistina 10 µg, tetraciclina 30 µg, ampicilina 25 µg, ciprofloxacina 05 µg, estreptomocina 10 µg, sulfametopim 25 µg, eritromicina 15 µg, amoxicilina 10 µg, penicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, sobre a superfície do meio inoculado. Em seguida com os discos, a placa foi incubada a 37°C por 18 horas.

O diâmetro dos halos inibitório de cada disco foi medido com auxílio de um paquímetro, para se determinar se a bactéria em análise foi sensível (S), moderadamente sensível (MS) ou resistente (R) aos antimicrobianos já citados, quando comparado com uma tabela padrão de antibiograma segundo [26].

Após a avaliação da resistência aos antimicrobianos as amostras selecionadas foram submetidas a análise de genes *Integrans C*, relacionados à resistência bacteriana aos antimicrobianos. Os *primers* utilizados foram genes integrantes da classe 1 de integrans 5'-GGCATCCAAGCAGCAA-3' e 5'-GAAGCAGACTTGACCTGA-3' [29-30].

A metodologia utilizada foi segundo [31-32] em que o DNA bacteriano foi obtido através do uso do *kit* de extração [12] amplificado pela PCR. Cada reação foi composta de 1,25 µl de cada primer, 12,5 µl de Gotaq [14], 5 µl de água ultrapura e 5 µl da amostra de DNA totalizando 25 µl. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto,

desnaturação a 54°C durante 1 minuto e extensão de cassetes de DNA a 72°C durante 2 minutos, com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos [15]. A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1,0%) [33] e corados com [16] e submetidos à eletroforese, em corrida de 100V por 50 minutos, com posterior análise sob luz ultravioleta [17].

A avaliação da atividade antimicrobiana utilizando cinco técnicas distintas foi realizada para verificar o antagonismo entre as amostras de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Heidelberg, esta proveniente do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária FMVZ Unesp-Botucatu/Brasil, confirmando assim o potencial antagonico. A primeira técnica o método de *Spot on the Lawn* constituiu se em semear as amostras de *Lactobacillus* spp. (AC) por 48 horas em caldo MRS (10 µl) a 37°C, as culturas foram adicionadas em forma de pontos em placa de Petri contendo ágar MRS e após estarem completamente secas, as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. A amostra de *Salmonella* Heidelberg (SH) foi semeada em caldo cérebro e coração (BHI) e incubado a 37°C por 18 horas. Posteriormente, foi transferida para novos tubos de BHI com 0,75% de ágar-ágar [34]. As placas incubadas anteriormente com as AC receberam o inóculo em sua superfície e, após a completa solidificação, as placas foram novamente incubadas a 37°C por 12 horas. Após esse período foi mensurado o halo de inibição formado a partir da borda da colônia de *Lactobacillus* spp.

O segundo teste foi o *cross-streak* modificado para se avaliar a atividade antimicrobiana segundo [35], em que foram feitos retângulos de 1 x 2 cm em placas de MRS com AC ( $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>), após incubação de 37°C por 24 horas as colônias foram retiradas e aplicado clorofórmio com auxílio de uma zaragatoa, e as placas incubadas por 1 hora, quando secas foram espalhados 100 µl do patógeno *Salmonella* Hedeilberg com incubação de 37°C por 24 horas e posterior avaliação do antagonismo medindo a zona de inibição em torno do crescimento do retângulo [36].

O terceiro teste *radial streak* para se observar as interações microbianas [37], a AC ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi inoculada em uma área circular no centro da placa de MRS e após 48 horas de incubação a 37°C a placa foi inoculada com o patógeno ( $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) em linhas radiais e novamente incubada por 24 horas a 37°C. A atividade inibidora do crescimento foi observada adaptando-se a metodologia de [38] em que foi medido o diâmetro da zona de inibição observado entre a AC e o patógeno.

O quarto teste *ágar well diffusion* para testar se o efeito inibidor do sobrenadante da cultura seria devido ao seu pH ácido ou se outros mecanismos estariam envolvidos

[37], AC foi cultivada em caldo MRS por 24 horas, incubadas a 37°C e após centrifugada [19] a 12.000 x g durante 20 minutos e esterilizada por filtração com membrana porosa de 0,20µm. O patógeno após incubação *overnight* em fase estacionária ( $10^7$ - $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) foi inoculado em placas de MRS, após foram feitos poços de 10 mm nas placas e 100 µl do filtrado de cada amostra foram colocados nos poços e incubados por 37°C durante 24 horas e a atividade antimicrobiana (zonas livres de crescimento) em torno dos poços, foi medida em milímetros.

O quinto teste realizado foi o *Liquid coculture assay* para se avaliar o potencial antagonico das amostras [37], em que uma alíquota de 2 ml de caldo MRS e *Tryptone Soya Broth* (TSB) na proporção 1:1 foi inoculado com 100 µl de cada AC juntamente com o patógeno ( $10^8$  ml UFC ml<sup>-1</sup>), incubadas a 37°C por 24 horas. Para verificar a inibição 50 µl dessa suspensão foi semeada em ágar TSB e incubada a 37°C por 48 horas. Foi comparado o crescimento com um controle negativo e o controle positivo. A presença de crescimento de bactérias patogênicas na placa de ágar foi interpretada como uma atividade inibitória de 25, 50 ou 75%, enquanto nenhum crescimento foi interpretado como uma atividade microbida (100% de inibição).

## RESULTADOS E DISCUSÃO

### *Identificação do gênero Lactobacillus*

Das 170 amostras isoladas, 74 tiveram resultados favoráveis nos testes fenotípicos conforme o seguinte padrão: positividade no teste de coloração de Gram em forma de bacilos Gram positivos e na produção de gás em glicose, negatividade nos testes de catalase, hidróxido de potássio e na produção de gás sulfídrico em TSI, sendo assim foram para etapa de extração de DNA, no entanto destas 74 amostras isolados somente 30 foram positivas na produção de gás em glicose, assim como descrito por [39], em que nem todas as amostras de *Latobacillus* spp. estudadas são positivas para o teste de gás em glicose.

As amostras que foram compatíveis nos demais requisitos citados, porém negativas na produção de gás em glicose também foram consideradas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, todas as amostras pré-selecionadas foram submetidas à confirmação por meio da PCR. As amostras que tiveram perfil compatível com a

amostra controle utilizada de *Lactobacillus* spp. foram submetidas as análises probióticas.

### ***Caracterização probiótica***

Para promover os efeitos benéficos o probiótico deve resistir e manter a viabilidade sob as condições adversas ou desafios impostos pelo organismo do hospedeiro. O primeiro desafio é o suco gástrico, que contém as enzimas gástricas digestivas que funcionam em um pH extremamente baixo. Muitas bactérias não sobrevivem bem em pH ácido [40]. Em perus existe uma relação entre o conteúdo proteico de uma dieta e a taxa de secreção do suco gástrico, mostrando que há uma fase gástrica no controle das secreções. No entanto quando o alimento ingerido alcança o proventrículo, este estimula a secreção gástrica (fase gástrica ou mecânica). O pH do suco gástrico varia de 0,5 a 3,0, a manutenção do pH em torno de 2 é ideal para transformação de pepsinogênio em pepsina. Já no intestino delgado o suco entérico das aves é em torno de pH 8, sendo que as enzimas pancreáticas e intestinais, possuem uma atividade digestiva primariamente no intestino delgado, com uma ótima taxa de atividade na faixa de pH entre 6 a 8 [41].

No presente experimento realizou-se 20 leituras com o total de 10 horas, porém somente os dados de 3 horas de incubação das amostras na presença do suco gástrico artificial foram utilizados como base para definir a porcentagem de inibição de uma amostra, pois como descrito por [41] nas aves é o período suficiente para passar o alimento sob ação do suco gástrico. As amostras foram expostas a dois tipos de pH, o controle em torno de 7,0 e o similar ao encontrado no sistema digestório de perus em torno de 2,5.

Nas análises realizadas 3 amostras tiveram taxa de inibição igual ou superior a 23%, mostrando sofrer influência da ação do suco gástrico e uma amostra não mostrou resultado no teste. As demais 70 amostras foram consideradas resistentes ao pH 2,5 não sofrendo ação do suco gástrico, sendo uma das características desejadas para que o *Lactobacillus* spp. desempenhe seu papel como probiótico.

Os resultados corroboram com [42-43] que observaram que bactérias de origem intestinais tendem a ser mais resistentes aos ácidos estomacais. Em seu experimento células viáveis decresceram 14,33% após 3 horas de incubação e em pH 2,5. Em pH 3,0 apresentou decréscimos menores que 11,35%. [44], em seu experimento relata que das

101 amostras testadas 13 estirpes foram classificadas como as melhores nos testes de suco gástrico apresentando a partir de 23% de taxa de inibição quando expostas ao pH 2,5 durante 3 horas.

Além de ter que tolerar o pH ácido no estômago, os probióticos têm como desafio os sais biliares intestinais. Os sais biliares representam moléculas com atividade antimicrobiana, rompendo membranas biológicas [9]. No teste de tolerância a sais biliares constatou-se que 58,11% das amostras tiveram a taxa de inibição entre 25% e 51%, diferindo dos resultados obtidos por [42-43], em que a taxa de inibição das amostras ficou entre 25% e 33%, 23 amostras tiveram resultados abaixo de 25% de inibição, 8 amostras não sofreram influência dos sais biliares, resultado desejado para uma amostra com características probióticas. As demais amostras sofreram ação dos sais biliares. [44] relata que apenas 13 amostras (12%) do total testado tiveram um taxa de inibição por sais biliares com incubação de 3 horas até 21,2%, sendo consideradas com melhor potencial probiótico. Segundo [45], quanto maior o número de bactérias presentes inicialmente na cultura analisada, maior a absorbância alcançada no tempo de incubação. Existindo a necessidade de padronização do inóculo, fato que não é notado em artigos científicos. Deste modo, pode haver uma variação na interpretação dos resultados relativa à classificação dos isolados quanto a sua capacidade de sobreviver na presença de sais biliares.

As amostras compatíveis com o gênero de *Lactobacillus* spp. foram inicialmente selecionadas conforme sua resistência ou por não sofrerem influência do suco gástrico ou sais biliares, mantendo-se desta forma viáveis no trato digestório da ave, após estas amostras foram avaliadas quanto ao seu potencial antagonico frente ao patógeno *Salmonella* Heidelberg.

O probiótico pode agir por antagonismo direto produzindo bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio tendo ação antibacteriana [46]. Dos testes de antagonismo o teste *Spot on the Lawn* (Figura 1A) mostrou seu antagonismo contra *Salmonella* Heidelberg devido formação de halos por 94,60% das amostras. Observou-se que das 74 amostras testadas para os testes de antagonismo contra *Salmonella* Heidelberg *radial streak* (Figura 1B), *ágar well diffusion* (Figura 1C), *liquid coculture assay* (Figura 1D) e *cross-streak* modificado (Figura 1E), 31 amostras (41,89%) apresentaram os melhores resultados somente no teste de *cross-streak* modificado, 7 amostras tiveram zonas de inibição  $\leq 2,5 \times 3$  cm sendo classificadas como boas e 31 com zonas de inibição  $\geq 2,5 \times 3$  cm classificadas como excelentes.

Estes resultados são compatíveis com os achados por [37], que cita este teste como o mais eficiente no estudo da atividade antimicrobiana usando células vivas de estirpes probióticas em comparação com os testes *radial streak* e *liquid coculture assay* que também usou células vivas e *ágar well diffusion* que utilizou sobrenadante. Os piores resultados foram obtidos no teste de *ágar well diffusion* em que apenas 10,81% do total de amostras demonstraram resultados, mostrando que mais de uma forma de avaliação da atividade antagonista contra patógenos deve ser estudada para se classificar uma amostra com potencial probiótico.

As amostras selecionadas na análises anteriores foram submetidas a avaliação do potencial de multiplicação e hidrofobicidade celular, estas são propriedades importantes de um probiótico, pois são à persistência e a multiplicação que proporcionam a implantação do mesmo, essencial para que a microbiota seja modificada em sua composição ou atividade [47-48]. O probiótico deve competir com a microbiota presente pelos nutrientes necessários e encontrar condições favoráveis para que haja sua multiplicação [49].

No Brasil segundo à Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, vinculada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, para que um probiótico seja aprovado na recomendação diária de consumo do produto final deve apresentar uma quantidade mínima viável de microrganismos na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC, porém valores menores são aceitos, desde que se comprove sua eficácia [50]. Neste experimento a taxa de multiplicação obtida no período de 3 horas de incubação foi de 82,43%, demonstrando que as amostras se multiplicaram rapidamente, ou seja, quando administradas as aves permaneceriam se multiplicando no sistema digestório.

A adesão a células epiteliais no sistema digestório também é um pré-requisito importante para a colonização de estirpes probióticas, impedindo a sua eliminação imediata através do peristaltismo e proporcionando uma vantagem competitiva neste ecossistema [47-48]. A auto agregação de estirpes probióticas torna-se necessária, para aderência às células epiteliais intestinais, formando uma barreira que evita a colonização por micro-organismos patogênicos [51-52-53]. Características físico-químicas da superfície da célula, tais como hidrofobicidade pode afetar a auto agregação e a adesão de bactérias a superfícies diferentes [53-54].

Neste experimento 32 amostras (41,89% do total) apresentaram baixa hidrofobicidade, segundo [23], isto mostra que estas amostras tem uma superfície

hidrófila (que tem atração pela água), provavelmente seriam facilmente eliminadas através do peristaltismo do sistema digestório, 34 amostras (45,94%) apresentaram resultados negativos, na literatura há poucos relatos sobre este tipo de resultado, porém segundo [55] concentrações crescentes de sulfato de amônio podem ser usadas para se converter estes resultados e se obter a real porcentagem de hidrofobicidade, no presente estudo quatro amostras (5,40%) apresentaram média hidrofobicidade e 4 (5,40%) alta hidrofobicidade, estas amostras permaneceriam aderidas por mais tempo a mucosa do trato gastrointestinal. [45], diz em seu estudo que a maior parte das estirpes isoladas em seu trabalho independentemente da sua origem, mostraram um baixo grau de hidrofobicidade, e sugere que esta pode ser uma característica da microbiota que coloniza a mucosa do animal em estudo.

No presente experimento a produção de peróxido de hidrogênio foi utilizada inicialmente para selecionar as bactérias catalase positivas na fase de identificação das amostras de *Lactobacillus* spp. nesta etapa a produção de peróxido de hidrogênio é analisada novamente para as bactérias que já foram selecionadas nas análises de suco gástrico, sais biliares, antagonismo, potencial de multiplicação e hidrofobicidade celular, porém em um meio modificado (TMB-Plus) que proporciona quantificar a intensidade da produção peróxido de hidrogênio (Figura 2). As amostras foram classificadas sem produção, quando não foi observada mudança de cor após incubação, baixa produção quando ficasse azul claro, média produção com tons de azul e alta produção com tons de azul escuro e/ou marrom, como descrito por [44].

Segundo [26], em seus estudos o crescimento e a produção de cor em 98% dos isolados foram equivalentes ou melhores em TMB-Plus do que em TMB em ágar. No geral, 70% dos isolados testados cresceram melhor, e 47% tiveram a coloração produzida mais intensa. Correlacionando o teste de antagonismo com o de produção de peróxido hidrogênio neste experimento, das amostras testadas, 14 (18,92%) do total não apresentaram produção de peróxido de hidrogênio, porém apresentaram antagonismo contra *Salmonella* Heidelberg em um dos testes, indicando que a ação antagônica pode estar relacionada com a produção de outra substância. 60 amostras (81,08%) apresentaram alta produção de peróxido de hidrogênio, ficando com coloração marrom, estas amostras apresentaram antagonismo contra *Salmonella* Heidelberg em pelo menos um dos testes de antagonismo, mostrando a ação bactericida do peróxido de hidrogênio.

A resistência às drogas antimicrobianas é definida como a capacidade que um organismo adquire de resistir a um agente quimioterápico ao qual era susceptível, e os

genes de resistência são transferidos por meio de trocas genéticas a outros micro-organismos, em decorrência disto deve se submeter às bactérias isoladas de espécimes clínicos aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos como a difusão em ágar [56].

No presente experimento foram estudados 12 antimicrobianos, [26], em seu trabalho obtiveram resistência da maioria das amostras em estudo por penicilinas e cefalosporinas, diferindo dos resultados obtidos em nosso experimento, em que a ampicilina e a cefalotina tiveram as menores porcentagens de resistência (penicilina 12,16% e cefalotina 29,73%), porém a bacitracina teve uma das maiores com 90,54%.

Estes mesmo autores relatam que todas as amostras estudadas em seu trabalho foram resistentes aos aminoglicosídeos corroborando com os resultados obtidos neste experimento em que 100% das amostras foram resistentes a esta classe (gentamicina e estreptomicina), todas as cepas deste trabalho citado (100%) foram sensíveis à tetraciclina e a ciprofloxacina, diferindo destes resultados a maioria das cepas de nosso experimento foram sensíveis a amoxicilina (44,59%), cefalotina (29,73%) e ampicilina (12,16%), estes autores também citam que suas amostras foram resistentes a sulfadiazina/trimetopin e a ao sulfato de colistina, em nosso experimento também se obteve os mesmos resultados com 81,08% e 100% de resistência respectivamente.

As regiões variáveis da classe 1 de *integrons*, estão associadas à resistência aos antibióticos [57-58]. Segundo dados [59] os agentes antimicrobianos reduzem a microbiota do trato gastrointestinal e aumentam a colonização por *Salmonella* spp. O gene para a resistência a agentes antimicrobianos (classe 1 *integron*) não foi observado em qualquer uma das amostras selecionadas analisadas por PCR, pode se observar que das amostras testadas, nenhuma mostrou possuir genes de resistência bacteriana.

Fazendo uma comparação com o trabalho de [31] que analisou amostras positivas para testes com antibiograma, mas não possuíam genes de resistência *integrons*, mostrando não haver nenhuma correlação com a presença do gene de resistência antimicrobiana (Classe 1 *integron*). Neste experimento as amostras apresentaram resistência a mais de 50% antimicrobianos testados, porém não apresentaram genes de resistência antimicrobianos.

### ***Identificação da espécie das amostras selecionadas***

A identificação de bactérias ácido-láticas por características fenotípicas torna-se muitas vezes inconclusiva, requerendo do pesquisador a realização de testes

complementares para determinar com precisão a espécie estudada. As amostras selecionadas (Tabela 1) foram submetidas ao sequenciamento e obteve-se, uma de *Lactobacillus frumenti*, 9 de *Lactobacillus reuteri* e uma de *Lactobacillus johnsonii*. Segundo [11], nos produtos comerciais probióticos disponíveis para animais como aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães e gatos as espécies de *Lactobacillus* spp. mais utilizadas são o *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johonsii*. Sendo estes micro-organismos não patogênicos derivados de microbiota normal de indivíduos da espécie animal que o produto for destinado [60].

### **CONCLUSÃO E APLICAÇÃO**

1. Neste experimento 11 cepas de *Lactobacillus* foram identificadas por características comprovadas através dos testes de caracterização probiótica e sequenciamento molecular.
2. Nos testes de antagonismo realizados o teste de *cross-streak* modificado mostrou-se o mais eficaz, as amostras demonstraram resistência a grande maioria dos antimicrobianos testados, porém não apresentaram genes de resistência integrons C, diminuindo a possibilidade de transferência de genes de resistência a outras bactérias.
3. Estas amostras, portanto são possíveis candidatas para comporem um produto com potencial probiótico para serem administradas *in vivo*.

### **REFERÊNCIAS**

- 1 Boyle, E.C., Bishop, L.J, Guntram, A.G. and Finlay, B.B. 2007. *Salmonella*: From pathogenesis to therapeutics. J. Bacteriol.: 189, 1489–1495.
- 2 Gast, R.K. *Salmonella* infections. 2003. Páginas 567-613. Diseases of Poultry. ed. Sai, M., Iowa, USA.
- 3 Andreatti Filho, R.L. 2007. Páginas 96-111. Paratifo aviário. Saúde Aviária e Doenças. ed. Roca, São Paulo, SP.
- 4 Velge, P., Cloeckert, A. and Barrow, P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet. Res. 36, 267-288.

- 5 Public Health Agency of Canada. 2007. *Salmonella* Heidelberg – Ceftiofur-Related Resistance in Human and Retail Chicken Isolates. Acessado em 20 de fevereiro, 2016. <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/heidelberg-eng.php>.
- 6 Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A. 2010. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. Recent Res. Sci. Technol., 2, 82-88.
- 7 Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals: a review. J. of Appl. Bacteriol. 66, 365-378.
- 8 Collins J.W., L.A Ragione, R. M., Woodward, M. J. and Searle, L. E. J. 2009. Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. Páginas 1123-1192. Prebiotics and probiotics science and technology. ed. Springer, New York, NY.
- 9 Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C. 2008. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. Microbiol. Mol. Biol. R., 72: 728.
- 10 Associação Brasileira de Proteína Animal 2014. Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>> Acessado em 23 de fevereiro, 2016.
- 11 Barros, M.R, Andreatti Filho, R.L, Oliveira, D.E, Lima, E.T and Crocci, A.J. 2009. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 61: 319-325.
- 12 kit Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kit (SIGMA®).
- 13 Dubernet, S., Desmasures, N. and Guéguen, M. 2002. A PCR-based method for identification of *lactobacilli* at the genus level. Microbiol. Let., 214: 271-275.
- 14 Gotaq Green Master Mix (Promega®).
- 15 Mastecycler gradiente (Eppendorf®)
- 16 GelRed™.
- 17 UVP®.
- 18 Neumann, E. 1991. Comportamento “in vitro” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. Msc. Diss. Univ, Federal de Viçosa, Viçosa.
- 19 Centrifuge 5415 R, Eppendorf®.
- 20 Thermo plate.

- 21 Walker, D.K. and Gilliland, S.E. 1993. Relationships Among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 76: 956-961.
- 22 PBS Accumedia-Neogen Corporation, Lansing, MI.
- 23 Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., and Bellon-Fontaine, M.N. 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ. Microbiol., 63, 1725-1731.
- 24 Nader-Macías, M.E., Otero MC, Espeche, M.C and Maldonado NC 2008. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. J. Ind. Microbiol. Biot. 35: 1387-1395.
- 25 Rabe, L.K. and Hillier S.L. 2003. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. J. Clin. Microbiol. 41: 3260-3264.
- 26 Charteris, P. Kelly, P.M.; Morelli, L.; and Collins, J.K. 1998. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. J. of Food Protec. 61: 1636-1643.
- 27 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos, 1º ed., 171pgs, 2012.
- 28 Discos de antibióticos, OXOID®.
- 29 Álvarez, F.M, Rodríguez, S.T, Brey, F.E, López, M.C and Piñeiro, L. 2003. Asociación entre integrones de clase 1 con resistencia a multiplex antimicrobianos y plásmidos conjugativos en Enterobacteriaceae. Rev. Esp. Quim. 16: 394-397.
- 30 Goldstein, C., Lee, M.D, Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G and Maurer, J.J. 2001. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. Antim. Agents and Chemother. 45: 723-726.
- 31 Okamoto, A.S., Andreatti Filho R.L, Rocha, TS, Menconi, Marietto-Gonçalves G.A. 2009. Detection and Transfer of Antimicrobial Resistance Gene Integron in Salmonella Enteritidis Derived from Avian Material. Rev. Bras. Cienc. Avic. 11: 195-201.
- 32 Silva, M.F, Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C and Manaia, C.M. 2006. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from a urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiol. Ecol. 1:1-11.
- 33 Electrophoresis Power Supply-EPS 901, (Amersham Biosciences).
- 34 Santos, W.L.M. 1993 Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen carnico. Dr. Tes. Univ, Complutense de Madrid, Madrid.

- 35 Fang, W., Shi, M., Huang, L., Chen, J. and Wang, Y. 1996. Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and in milk. *Vet. Res.* 27: 3–12.
- 36 Verdenelli, M.C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C. and Cresci, A. 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur. J. Nutr.* 48: 355–363.
- 37 Coman, M.M., Verdenelli, MC, Cecchini, C, Silvi, S., Orpianesi, C and Boyko, N. 2014. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup>, *Lactobacillus paracasei* IMC 502<sup>®</sup> and SYN BIO<sup>®</sup> against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 117: 518-527.
- 38 Bosch, M., Nart, J., Audivert, S, Bonachera, M.A, Alemany, A.S, Fuentes, M.C and Cuñé, J. ANO. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch. Oral Biol.* 57: 539-549.
- 39 Collins, E.B and Hartlein, K. 1992. Influences of Temperature on *Lactobacilli* of Nonfermented Acidophilus Milks. *J. Dairy Sci.* 65: 883-886.
- 40 Jin, L.Z, Ho, Y.W, Abdullah, N., and Jalaludin, S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27, 183-185.
- 41 Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. 2002. Páginas 101-108 Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. ed. Funep/Unesp, Jaboticabal, SP.
- 42 Morelli, L. 2000. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol.* 1: 59-67.
- 43 Silva, B.C. 2011. Seleção de Bactérias Lácticas com Potencial Probiótico para Uso como Veículos Vacinais Orais Contra a Leptospirose Canina. Msc. Diss. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 44 Feng, J, Wang, L, Zhou, L, Yang, X, Zhao, X. 2016. Using In Vitro Immunomodulatory Properties of Lactic Acid Bacteria for Selection of Probiotics against Salmonella Infection in Broiler Chicks. *PLOS One.* 11: 1-14.
- 45 Alvim, L.B. 2011. Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos. Msc. Diss. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 46 Freitas, E.D, Rabello, C.B.V and Watanabe, P.H. 2014. Páginas 487-496 Nutrição de não ruminantes. ed. Funep, Jaboticabal, SP.
- 47 Pedersen, K. 1989. and Tannock, G.W. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. *Ap. and Envir. Microbiol.* 55: 279–283.

48 Alander, M., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Matilla-Sandholm, T. and Wright, A. 1997. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. Appl. Microbiol. 24: 361–364.

49 Trabulsi, L.R. and Sampaio, M.M.S.C. 2000. A composição e o papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. Os Probióticos e a Saúde Infantil, 1, 3-11.

50 Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

51 Reid, G., Mcgroarty, J.A., Angotti, R. and Cook, R.L. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. Canadian J. of Microbiol. 34: 344–351.

52 Boris, S., Suárez, J.E and Barbés, C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. J. of Appl. Microbiol. 83: 413–420.

53 Del, R.E, Sgorbati, B., Miglioli, B. and Palenzona, M. D. 2000. Adhesion, auto aggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. Letters in Appl. Microbiol. 31: 438–442.

54 Wadstrom, T., Andersson, K., Sydow, M., Axelsson, L., Lindgren, S. and Gullmar, B. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J. of Appl. Bacteriol. 62: 513–520.

55 Schmidt,H., Schloricke,E., Fislage, R., Schulzeand, H.A., Guthoff, R. Effect of Surface Modifications of Intraocular Lenses on the Adherence of *Staphylococcus epidermidis*. Zent.bl. Bakteriol. 287, 135-145, 1998.

56 Madigan, M.T, Martinko, J.M, and Parker, J. 2004. Páginas 546-553. Microbiologia de Brock. ed. Pearson Education, Brasil.

57 Álvarez, F.M, Rodríguez, S.T, Brey, F.E, López, M.C and Piñeiro, L. 2003. Asociación entre integrones de clase 1 com resistência a multiplex antimicrobianos y plásmidos conjugativos en Enterobacteriaceae. Rev. Esp. Quim. 16: 394-397.

58 Goldstein, C., Lee, M.D, Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G and Maurer, J.J. 2001. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. Antim. Agents and Chemother. 45: 723-726.

59 Organização Mundial da Saúde Animal.2015. Prevención, detección y control de las infecciones de aves de corral por salmonela. Acessado em 01 de agosto de 2016

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_prevent\\_salmonella.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf).

60 Butolo, J.E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. IN; Simpósio sobre as implicações socioeconômicas do uso de aditivos na nutrição animal, 1999, PIRACICABA. ANAIS... PIRACICABA: CBNA, p. 85-94.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à agência FAPESP auxílio n° 2015/00383-2 pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Tabela 1: Resultados das amostras selecionadas em todas as análises realizadas.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Análises</b>											
A	15,12	4,51	0	2,06	1,31	0	0	13,76	0	1,33	8,81
B	22,01	11,60	16,69	13,57	0	23,80	22,03	18,58	35,19	45,37	0
C	0,60	0,53	0,70	0,60	0,60	0,60	0,60	0,50	0,27	0,47	0,50
D	2,30	1,80	2,80	2,53	0,53	2,85	0,45	2,53	2	0,50	3,07
E	0	25	22	0	0	0	0	18	0	0	17
F	50	50	25	0	25	75	10	50	75	25	50
G	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+	++++	+	++++	++++
H	8,0.10 <sup>6</sup>	8,6 .10 <sup>4</sup>	9,5.10 <sup>6</sup>	8,0.10 <sup>8</sup>	6,5.10 <sup>8</sup>	6,2.10 <sup>6</sup>	5,5.10 <sup>7</sup>	7,3.10 <sup>7</sup>	9,5.10 <sup>7</sup>	8,0.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>7</sup>
I	0	0	7,40	0	11,13	5,88	3,40	0	0	0	0
J	a*	s*	a	a	a	a	a	a	a	s	a

1 (*Lactobacillus frumenti*), 2 (*Lactobacillus reuteri*), 3 (*Lactobacillus reuteri*), 4 (*Lactobacillus reuteri*), 5 (*Lactobacillus reuteri*), 6 (*Lactobacillus reuteri*), 7 (*Lactobacillus reuteri*), 8 (*Lactobacillus reuteri*), 9 (*Lactobacillus reuteri*), 10 (*Lactobacillus johnsonii*), 11 (*Lactobacillus reuteri*), A (suco gástrico %), B (sais biliares %), C (*spot on the lawn cm*), D (*radial streak cm*), E (*agar well diffusion mm*), F (*liquid coculture assay %*), G (*cross streak modificado cm*), H (potencial de multiplicação em Unidades Formadoras de Colônia-UFC), I (hidrofobicidade %), J (produção de peróxido de hidrogênio). \*A (alta produção de peróxido de hidrogênio), •S (sem produção de peróxido de hidrogênio). + zona de inibição ≤ 2 x 1,5 cm, +++ zona de inibição ≤ 2,5 x 3,0 cm, ++++ zona de inibição ≥ 2,5 x 3 cm; \*a (alta produção de peróxido de hidrogênio), •s (sem produção de peróxido de hidrogênio).

FIGURA 1- Testes de antagonismo das amostras de *Lactobacillus* spp. (L) contra *Salmonella* Heidelberg (SH), (A) *Spot on the Law*, (B) *radial streak*, (C) *ágar well diffusion*, (D) *liquid coculture assay* sem inibição da SH, (E) *liquid coculture assay* com inibição da SH, (F) *cross-streak* modificado.

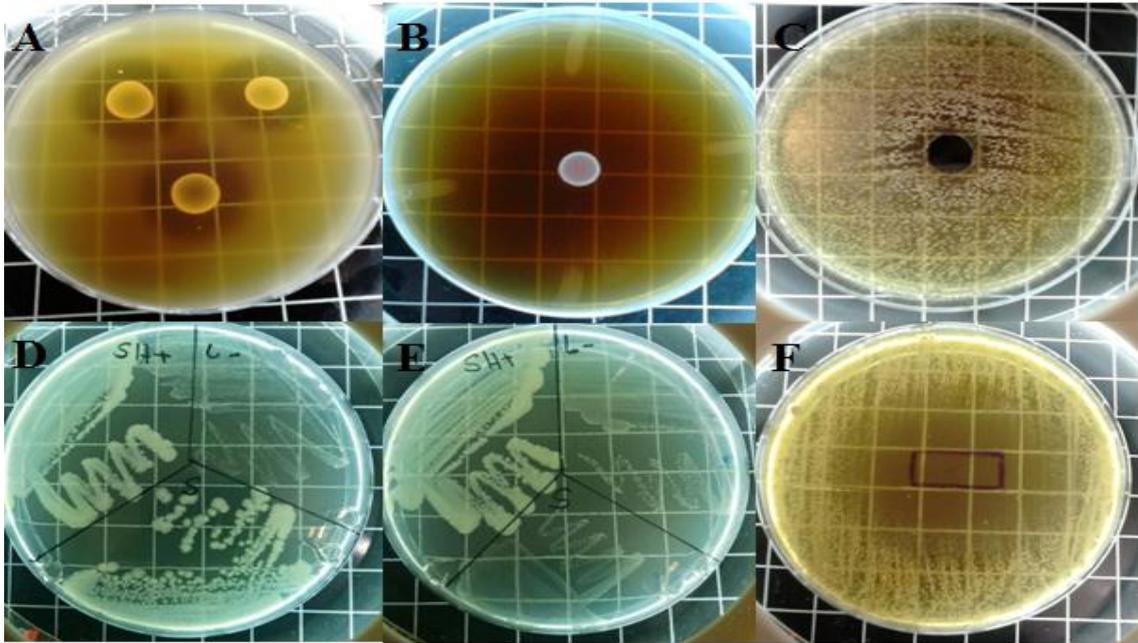


FIGURA 2- Intensidade de amostras produtoras de Peróxido de Hidrogênio



**NORMAS DE ENVIO PARA JOURNAL OF APPLIED POULTRY RESEARCH**

Link: [http://www.oxfordjournals.org/our\\_journals/japr/for\\_authors](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/japr/for_authors)

Apêndice Tabela 2. Resultados da porcentagem (%) de inibição de crescimento dos isolados em presença de suco gástrico artificial e sais biliares em 3 horas de incubação, segundo técnica de Neumann (1991) e Walker e Gilliland (1993).

AMOSTRAS	SUCO GÁSTRICO	SAIS BILARES	AMOSTRAS	SUCO GÁSTRICO	SAIS BILIARES
1	-3,27	26,77	39	-1,48	46,24
2	16,24	25,96	40	0,77	20,58
3	0,57	36,52	41	-1,21	25,09
4	-4,49	21,70	42	-3,76	16,77
5	15,12	22,01	43	-13,76	24,55
6	-1,10	45,39	44	-0,83	34,66
7	2,02	28,98	45	9,10	36,30
8	4,51	11,60	46	-5,04	-144,66
9	-0,60	16,69	47	0,00	-29,80
10	27,30	26,15	48	26,68	-49,70
11	-4,44	38,66	49	5,24	39,72
12	2,06	13,57	50	7,58	46,80
13	13,44	10,66	51	7,98	25,85
14	11,31	-117,65	52	-4,45	45,80
15	2,28	-37,60	53	2,47	-1,32
17	30,21	5,36	54	-2,78	28,91
18	0,00	23,80	55	-11,99	35,19
19	-2,35	20,58	56	1,30	51,15
20	10,04	35,80	57	21,14	49,02
21	-5,13	22,03	58	1,35	45,37
22	-0,74	40,00	59	-115,00	37,78
23	1,65	11,80	60	3,73	41,70
24	1,20	32,83	61	-1,87	-61,97
25	-2,19	31,18	62	1,64	6,03
26	13,76	18,58	63	16,22	6,70
27	2,17	32,29	64	8,81	-185,11
28	-0,32	24,30	65	-2,25	25,59
29	-8,68	38,24	66	-25,97	30,94
30	0,64	42,86	67	-28,47	15,40
31	-3,77	31,33	68	-1,66	36,07
32	3,05	21,43	69	-14,73	26,32
33	1,76	38,54	70	-12,27	33,54
34	-4,59	43,35	71	-25,88	21,50
35	0,77	28,79	72	-9,83	31,54
36	-16,77	17,29	73	-9,83	29,10
37	-9,81	36,51	74	-11,66	33,69
38	5,30	8,43	*75	0	1,90

\* não foi realizado o teste.

Apêndice Tabela 3. Resultados em centímetros do teste de antagonismo *Spot on the Lawn* contra *Salmonella* Heidelberg, segundo técnica de Santos (1993).

<b>AMOSTRAS</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>AMOSTRAS</b>	<b>MÉDIA</b>
<b>1</b>	0,60	<b>39</b>	0,60
<b>2</b>	0,43	<b>40</b>	0,53
<b>3</b>	0,30	<b>41</b>	0
<b>4</b>	0,33	<b>42</b>	0,60
<b>5</b>	0,60	<b>43</b>	0,60
<b>6</b>	0,37	<b>44</b>	0,40
<b>7</b>	0,50	<b>45</b>	0,50
<b>8</b>	0,53	<b>46</b>	0,50
<b>9</b>	0,70	<b>47</b>	0,17
<b>10</b>	0,67	<b>48</b>	0,40
<b>11</b>	0,53	<b>49</b>	0,40
<b>12</b>	0,60	<b>50</b>	0
<b>13</b>	0,53	<b>51</b>	0,10
<b>14</b>	0,60	<b>52</b>	0,00
<b>15</b>	0,50	<b>53</b>	0,50
<b>17</b>	0,50	<b>54</b>	0,30
<b>18</b>	0,60	<b>55</b>	0,27
<b>19</b>	0,47	<b>56</b>	0,57
<b>20</b>	0,53	<b>57</b>	0,57
<b>21</b>	0,60	<b>58</b>	0,47
<b>22</b>	0,60	<b>59</b>	0,50
<b>23</b>	0,50	<b>60</b>	0,50
<b>24</b>	0,47	<b>61</b>	0,30
<b>25</b>	0,57	<b>62</b>	0,23
<b>26</b>	0,50	<b>63</b>	0
<b>27</b>	0,60	<b>64</b>	0,50
<b>28</b>	0,67	<b>65</b>	0,63
<b>29</b>	0,77	<b>65</b>	0
<b>30</b>	0,50	<b>67</b>	0,50
<b>31</b>	0,60	<b>68</b>	0,63
<b>32</b>	0,20	<b>69</b>	0,43
<b>33</b>	0,63	<b>70</b>	0,63
<b>34</b>	0,57	<b>71</b>	0,53
<b>35</b>	0,50	<b>72</b>	0,50
<b>36</b>	0,10	<b>73</b>	0,50
<b>37</b>	0,50	<b>74</b>	0,57
<b>38</b>	0,70	<b>75</b>	0,67

Apêndice Tabela 4. Resultados do teste *Radial Streak* em centímetros com atividade inibidora do crescimento (AIC) segundo técnica adaptada de Bosch, *et al.*, (2012).

<b>AMOSTRAS</b>	<b>AIC</b>	<b>AMOSTRAS</b>	<b>AIC</b>
1	0	39	4,0
2	2,5	40	0
3	2,65	41	5,25
4	4,75	42	6,5
5	5,5	43	4,5
6	3,75	44	3,0
7	6,75	45	0
8	3,06	46	0
9	3,15	47	6,9
10	4,16	48	0
11	3,25	49	7
12	6,05	50	5,5
13	4,43	51	6,25
14	2,25	52	2,0
15	7,25	53	0
17	5,7	54	2,3
18	6,7	55	5,5
19	4,4	56	5,0
20	3,75	57	5,75
21	0	58	0
22	0,5	59	0
23	5,7	60	6,25
24	7,25	61	0
25	6,15	62	0
26	3,1	63	0
27	0	64	5,75
28	0	65	7,15
29	5,5	66	4,75
30	6,8	67	6,15
31	0	68	3,7
32	5,65	69	3,46
33	6,75	70	0
34	0	71	4,66
35	2,75	72	5,25
36	6,15	73	1,75
37	3,8	74	5,5
38	4,95	75	4,5

Apêndice Tabela 5. Resultados do teste *ágar well diffusion* em milímetros das zonas livres de crescimento (ZLC) segundo Mami *et al.*, (2008).

<b>AMOSTRAS</b>	<b>ZLC</b>	<b>AMOSTRAS</b>	<b>ZLC</b>
1	0	39	0
2	0	40	0
3	20	41	0
4	0	42	0
5	0	43	0
6	0	44	0
7	20	45	0
8	25	46	0
9	22	47	0
10	20	48	0
11	0	49	0
12	0	50	0
13	0	51	0
14	0	52	0
15	0	53	0
17	0	54	0
18	0	55	0
19	0	56	0
20	16	57	0
21	0	58	0
22	0	59	0
23	0	60	0
24	18	61	0
25	0	62	0
26	18	63	0
27	0	64	17
28	0	65	0
29	0	66	0
30	0	67	0
31	0	68	0
32	0	69	0
33	0	70	0
34	0	71	0
35	0	72	0
36	0	73	0
37	0	74	18
38	0	75	0

Apêndice Tabela 6. Resultados do teste *liquid coculture assay* da porcentagem de atividade inibitória das amostras contra a *Salmonella* Heidelberg segundo Coman, (2014).

AMOSTRAS	++++	+++	++	+	-	AMOSTRAS	++++	+++	++	+	-
1			x			39			x		
2		x				40		x			
3		x				41			x		
4	x					42		x			
5			x			43			x		
6	x					44	x				
7			x			45		x			
8			x			46			x		
9		x				47			x		
10		x				48			x		
11		x				49		x			
12	x					50		x			
13			x			51		x			
14		x				52				x	
15		x				53	x				
17			x			54			x		
18				x		55				x	
19				x		56		x			
20			x			57	x				
21					x	58		x			
22		x				59					
23			x			60		x			
24			x			61				x	
25			x			62		x			
26			x			63			x		
27					x	64			x		
28		x				65			x		
29	x					66		x			
30		x				67			x		
31		x				68	x				
32		x				69			x		
33			x			70			x		
34	x					71			x		
35	x					72	x				
36		x				73			x		
37		x				74	x				
38				x		75	x				

++++ nenhuma inibição, +++ 25% de inibição, ++ 50% de inibição, + 75% de inibição, - 100% de inibição.

Apêndice Tabela 7. Resultados do testecross-streak modificado das amostras contra *Salmonella* Heidelberg, segundo Verdenelli, *et al.*, (2009).

AMOSTRAS	-	+	++	+++	++++	AMOSTRAS	-	+	++	+++	++++
1				x		39	x				
2			x			40					x
3	x					41			x		
4			x			42					x
5				x		43					x
6			x			44					x
7				x		45	x				
8					x	46		x			
9					x	47		x			
10					x	48	x				
11					x	49	x				
12					x	50	x				
13					x	51			x		
14					x	52					
15					x	53	x				
17			x			54	x				
18					x	55		x			
19			x			56	x				
20		x				57	x				
21		x				58					x
22				x		59					x
23				x		60	x				
24	x					61					x
25					x	62	x				
26					x	63			x		
27				x		64					x
28		x				65					x
29				x		66					x
30					x	67			x		
31					x	68		x			
32					x	69					x
33						70		x			
34					x	71					x
35					x	72		x			
36			x			73					x
37	x					74					x
38	x					75					x

- não houve inibição, + zona de inibição  $\leq 2 \times 1,5$  cm, ++ zona de inibição  $\leq 2 \times 2,5$  cm, +++ zona de inibição  $\leq 2,5 \times 3,0$  cm, ++++ zona de inibição  $\geq 2,5 \times 3$  cm.

Apêndice Tabela 8. Resultados das médias e das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do teste de multiplicação *in vitro* de amostras com potencial probiótico no período de 3 horas.

<b>AMOST RAS</b>	<b>UFC</b>	<b>AMOST RAS</b>	<b>UFC</b>
<b>1</b>	$6,8 \cdot 10^6$	<b>39</b>	$6,0 \cdot 10^5$
<b>2</b>	$7,9 \cdot 10^7$	<b>40</b>	$6,0 \cdot 10^7$
<b>3</b>	$3,4 \cdot 10^6$	<b>41</b>	$2,4 \cdot 10^6$
<b>4</b>	$9,5 \cdot 10^5$	<b>42</b>	$5,4 \cdot 10^5$
<b>5</b>	$8,0 \cdot 10^6$	<b>43</b>	$1,8 \cdot 10^8$
<b>6</b>	$5,2 \cdot 10^6$	<b>44</b>	$3,0 \cdot 10^4$
<b>7</b>	$4,0 \cdot 10^5$	<b>45</b>	$2,2 \cdot 10^8$
<b>8</b>	$8,6 \cdot 10^4$	<b>46</b>	$9,5 \cdot 10^7$
<b>9</b>	$9,5 \cdot 10^6$	<b>47</b>	$9,5 \cdot 10^7$
<b>10</b>	$7,7 \cdot 10^6$	<b>48</b>	$9,5 \cdot 10^7$
<b>11</b>	$6,8 \cdot 10^8$	<b>49</b>	$5,5 \cdot 10^8$
<b>12</b>	$8,0 \cdot 10^8$	<b>50</b>	$8,0 \cdot 10^6$
<b>13</b>	$1,7 \cdot 10^6$	<b>51</b>	$3,7 \cdot 10^8$
<b>14</b>	$6,5 \cdot 10^8$	<b>52</b>	0
<b>15</b>	$4,2 \cdot 10^6$	<b>53</b>	0
<b>17</b>	$5,0 \cdot 10^8$	<b>54</b>	$9,0 \cdot 10^7$
<b>18</b>	$6,2 \cdot 10^6$	<b>55</b>	$9,5 \cdot 10^7$
<b>19</b>	$5,4 \cdot 10^7$	<b>56</b>	$6,0 \cdot 10^7$
<b>20</b>	$9,5 \cdot 10^8$	<b>57</b>	$8,0 \cdot 10^7$
<b>21</b>	$5,5 \cdot 10^7$	<b>58</b>	$8,0 \cdot 10^7$
<b>22</b>	$4,0 \cdot 10^8$	<b>59</b>	$9,0 \cdot 10^8$
<b>23</b>	$2,5 \cdot 10^4$	<b>60</b>	$3,0 \cdot 10^{12}$
<b>24</b>	$7,0 \cdot 10^5$	<b>61</b>	$9,0 \cdot 10^7$
<b>25</b>	$4,5 \cdot 10^4$	<b>62</b>	$7,0 \cdot 10^6$
<b>26</b>	$7,3 \cdot 10^7$	<b>63</b>	$7,8 \cdot 10^8$
<b>27</b>	$5,0 \cdot 10^4$	<b>64</b>	$9,5 \cdot 10^7$
<b>28</b>	$3,1 \cdot 10^8$	<b>65</b>	$6,5 \cdot 10^7$
<b>29</b>	$8,0 \cdot 10^7$	<b>66</b>	$4,0 \cdot 10^6$
<b>30</b>	$3,7 \cdot 10^6$	<b>67</b>	$4,3 \cdot 10^6$
<b>31</b>	0	<b>68</b>	$1,5 \cdot 10^6$
<b>32</b>	$4,4 \cdot 10^7$	<b>69</b>	$5,0 \cdot 10^7$
<b>33</b>	$7,5 \cdot 10^8$	<b>70</b>	$5,6 \cdot 10^6$
<b>34</b>	0	<b>71</b>	$9,5 \cdot 10^8$
<b>35</b>	$4,5 \cdot 10^6$	<b>72</b>	$7,4 \cdot 10^6$
<b>36</b>	$1,0 \cdot 10^7$	<b>73</b>	$3,7 \cdot 10^6$
<b>37</b>	$6,6 \cdot 10^8$	<b>74</b>	$4,6 \cdot 10^6$
<b>38</b>	$6,2 \cdot 10^7$	<b>75</b>	$2,1 \cdot 10^6$

Apêndice Tabela 9. Porcentagem (%) de hidrofobicidade das amostras e classificação das mesmas segundo Nader-Macias *et al.*, (2008).

<b>AMOSTRAS</b>	<b>% HIDROFOBICIDADE</b>	<b>AMOSTRAS</b>	<b>% HIDROFOBICIDADE</b>
1	3,76	39	3,76
2	7,22	40	-9,72
3	6,73	41	0
4	-1,33	42	-3,84
5	-8,32	43	67,43
6	5,36	44	6,03
7	-41,09	45	-13,44
8	-19,46	46	-7,13
9	7,40	47	5,36
10	-2,29	48	29,13
11	-33,75	49	-0,22
12	-1,08	50	29,50
13	46,59	51	7,42
14	11,13	52	-2,26
15	-12,97	53	-3,86
17	-6,56	54	72,82
18	5,88	55	-5,83
19	2,16	56	2,38
20	5,33	57	12,40
21	3,40	58	-4,42
22	-100,46	59	-2,17
23	-35,80	60	7,06
24	54,11	61	0,92
25	2,56	62	0,64
26	-4,20	63	-3,98
27	13,95	64	-0,45
28	5,61	65	-10,83
29	4,08	66	0
30	4,79	67	-3,56
31	62,14	68	-2,12
32	84,12	69	-3,12
33	72,45	70	-13,87
34	8,92	71	5,49
35	13,01	72	-1,82
36	-21,40	73	-9,57
37	59,14	74	-5,92
38	-3,67	75	7,31

Apêndice Tabela 10. Classificação do teste de produção de peróxido de hidrogênio segundo Silva, (2011).

AMOSTRAS	-	+	++	+++	AMOSTRAS	-	+	++	+++
1				x	39	x			
2				x	40				x
3				x	41				x
4				x	42				x
5				x	43				x
6				x	44				x
7				x	45				x
8	x				46	x			
9				x	47				
10				x	48	x			
11				x	49				x
12				x	50				x
13				x	51				x
14				x	52				x
15				x	53	x			
17	x				54	x			
18				x	55				x
19				x	56				x
20				x	57	x			
21				x	58	x			
22				x	59	x			
23				x	60				x
24				x	61	x			
25				x	62				x
26				x	63				x
27				x	64				x
28				x	65				x
29				x	66				x
30	x				67				x
31				x	68	x			
32				x	69				x
33				x	70				x
34				x	71				x
35				x	72				x
36				x	73				x
37				x	74				x
38				x	75	x			

.- Nenhuma produção H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; + baixa produção, ++ média produção; +++ alta produção.

Apêndice Tabela 11. Interpretação dos testes de antibiograma segundo Charteris, (1998).

AMOSTRAS	AMO	B	EST	SZT	CFL	GEN	CT	TE	E	CIP	PEN	AMP
1	R	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	R
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	S
3	S	MS	R	R	S	R	R	R	S	R	MS	S
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS
5	R	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	MS
6	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
7	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	S
8	MS	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	MS
9	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
10	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
11	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
13	MS	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	S
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS
17	R	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	MS
18	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	S
19	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	S
20	MS	MS	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	S
21	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MS	S	S
22	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R
23	MS	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	MS
24	MS	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	MS	S
25	S	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	S
26	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	R
27	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	S
28	R	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	MS
29	S	MS	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S
30	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	MS
31	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
32	R	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	S
33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	S
35	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
36	MS	R	R	MS	R	R	R	R	S	R	MS	S
37	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
38	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	R
39	R	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	R
40	MS	R	R	MS	MS	R	R	R	R	R	R	S
41	MS	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	S
42	R	R	R	R	MS	R	R	R	MS	R	R	MS
43	MS	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	MS	MS
44	MS	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	S
45	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
46	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	MS
47	S	R	R	MS	S	R	R	MS	MS	R	MS	R
48	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
49	S	R	R	MS	S	R	R	R	MS	R	R	S
50	S	R	R	MS	MS	R	R	S	S	R	MS	S
51	S	R	R	MS	MS	R	R	R	MS	R	MS	S
52	S	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R
53	R	R	R	R	MS	R	R	R	S	R	MS	MS
54	S	MS	R	MS	S	R	R	S	S	R	MS	MS
55	S	R	R	MS	S	R	R	R	S	R	MS	S
56	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	MS	S

57	S	R	R	R	S	R	R	S	MS	R	MS	S
58	S	R	R	MS	S	R	R	MS	R	R	R	S
59	S	MS	R	S	MS	R	R	R	S	R	S	R
60	S	MS	R	R	MS	R	R	S	S	R	S	MS
61	S	R	R	MS	S	R	R	R	MS	R	S	S
62	S	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	R	S
63	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	R
64	S	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	S
65	MS	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	R	MS
66	S	R	R	R	MS	R	R	R	R	R	R	S
67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS
68	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	MS	S
69	MS	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	S
70	S	R	R	R	S	R	R	R	MS	R	MS	S
71	S	MS	R	MS	S	R	R	R	S	R	S	S
72	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	R	S
73	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	S
74	R	R	R	R	MS	R	R	R	S	R	MS	R
75	MS	R	R	R	MS	R	R	MS	R	R	MS	R

---

**R referente a resistente, MS referente a moderadamente sensível e S referente a sensível.**