UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* NO DESEMPENHO DE BEZERROS DA RAÇA HOLANDESA

Gisela Rojas Garcia

Farmacêutica

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* NO DESEMPENHO DE BEZERROS DA RAÇA HOLANDESA

Gisela Rojas Garcia

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2008

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

GISELA ROJAS GARCIA – Filha de Luiz Antônio Garcia e Deana Rojas Garcia, nasceu aos 04 de julho de 1979, na cidade de Jaboticabal/SP. Concluiu o curso de Farmácia pela Universidade de Marília no ano de 2000, onde também obteve o título de especialização em bioquímica no ano de 2001. Em março de 2003, ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, onde obteve o título de Mestre em março de 2005. Ingressou no curso de Doutorado, curso de Microbiologia Agropecuária pela mesma instituição, e em março de 2008, obteve o título de Doutora.

Dedico

Ao meu esposo **Rogério,**

pelo amor,

dedicação, paciência,

incentivo e companheirismo.

Ofereço

Aos meus pais **Luiz** e **Deana** e à
minha **família**, por todo carinho,
incentivo e exemplos de
determinação e coragem.

Aos meus sogros **Osvaldo** e **Leonice**
e à minha cunhada **Ruchele**,
pelo apoio incondicional,
exemplos de força e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal) e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino pela orientação e demonstração de paciência e compreensão durante os anos de convívio, e principalmente pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis pelo apoio, ensinamentos, por permitir a realização dos trabalhos nas suas dependências, e principalmente, pelo incentivo ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier pelo apoio e auxílio prestados durante a execução do trabalho.

Aos amigos Felipe e Amanda pela grande dedicação e ajudas constantes na condução dos experimentos de campo.

Aos amigos de trabalho do Departamento de Microbiologia: Adriana (Dri), Silvina (Sil), Tammy e Carol, pelos momentos de apoio e atenção, nos quais nos tornamos grandes amigas. Também a Márcia, Gislaine, Mariana, Edna, Rosangela, Lurdinha, Juliano e César, por todos esses anos de convívio, amizade e companheirismo.

À todos os professores da Pós-Graduação pela amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao Rogério e Ruchele, por fazerem com que o doutorado fosse não somente um período de crescimento profissional, mas também de crescimento pessoal.

A FATEC - Dr. Pedro Abe e BELLMAN – Dr. Marco Antonio A. Balsalobre pelo apoio financeiro concedido e pela confiança na execução do trabalho.

SUMÁRIO

Itens	Página
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Summary	x
I. Introdução	01
II. Revisão de Literatura	02
2.1. Probióticos	02
2.1.1. Importância dos Probióticos na Produção Animal	03
2.1.2. Sistemática de Ação dos Probióticos	04
2.2. *Bacillus subtilis* – Características Gerais, Importância na Utilização como Probiótico e Produção de Bacteriocinas	06
2.3. Efeito de Probióticos em Bezerros	08
2.3.1. Descrição das Bactérias Patogênicas que Frequentemente acometem Bezerros	11
2.3.1.1. *Clostridium perfringens*	11
2.3.1.2. *Escherichia coli*	12
2.3.1.3. Salmonella spp	12
2.4. Outras Substâncias Orgânicas que Inibem a Multiplicação de Microrganismos	13
2.4.1. EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético	13
III. Objetivos	14
3.1. Objetivos Gerais	14
3.2. Objetivos Específicos	14
IV. Material e Métodos	15
4.1. Experimento 1	15
4.1.1. Viabilidade e Enumeração dos Microrganismos Utilizados “in vitro”	16
4.1.1.1. *Bacillus subtilis*	16
4.1.1.2. *Escherichia coli*	16
4.1.1.3. *Clostridium perfringens*	17
4.1.1.4. *Salmonella spp*	17
4.1.2. Detecção da Atividade antimicrobiana do *Bacillus subtilis*	18
4.1.2.1. Teste de Inibição	18
4.1.2.2. Caracterização do Efeito Inibitório	19
4.1.3. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana	20
4.1.4. Determinação do Efeito de Outras Substâncias Antimicrobianas sobre a Multiplicação de *Escherichia coli, Escherichia coli* (ATCC 25922)*, Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* em Combinação de *Bacillus subtilis* ou Nisina	20
4.1.4.1. Determinação do Efeito do EDTA	20
4.2. Experimento 2	22

4.2.1. Avaliação da Eficiência do Probiótico no Consumo de Matéria Seca, Perímetro Torácico, Desempenho, Consistência Fecal e Incidência de Doenças em Bezerros da Raça Holandesa..... 22
4.2.1.1. Local, Animais, Instalações e Manejo Sanitário..... 22
4.2.1.2. Dietas Experimentais e Manejo de Alimentação..... 24
4.2.1.3. Coleta das Amostras e Análises Químico-Bromatológicas... 26
4.2.1.4. Teste de Desafio Bacteriano e Parâmetros Sanguíneos..... 26
4.2.1.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística..... 29
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 29
5.1. Experimento 1..... 29
5.2. Experimento 2..... 35
5.2.1. Ganho de Peso e Perímetro Torácico..... 35
5.2.2. Consumo de Matéria Seca e Conversão Alimentar..... 39
5.2.3. Desafio bacteriano e Presença de *Bacillus* spp e *E. coli* nas Fezes..... 44
5.2.4. Escore de Fezes e Parâmetros Sanguíneos..... 46
VI. CONCLUSÕES..... 47
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	"American Type Culture Collection"
B.subtilis	*Bacillus subtilis*
BHI	"Brain Heart Infusion" ou Infusão Cérebro Coração
C.perfringens	*Clostridium perfringens*
CGV	Contagem Glóbulos Vermelhos
CHGM	Volume Globular Médio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DOX	Doxiciclina
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EE	Extrato Etéreo
EST	Estreptomicina
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDN	Fibra Detergente Neutro
GLOBAL	Contagem Global de Leucócitos
GPVD	Ganho de Peso Diário Vivo
Hb	Hemoglobina
HGM	Hemoglobina Globular Média
HTC	Hematócrito
L.acidophilus	*Lactobacillus acidophilus*
LPS	Lipopolissacarídeo
MC	"Mac-Conkey"
MS	Matéria Seca
NA	"Nutrient Agar" ou Ágar Nutriente
NOR	Norfloxacina
PB	Proteína Bruta
S.cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SPS	Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina
SUT	Cotrimoxazol
TET	Tetraciclina
TRI	Trimetoprima
TSA	"Tripticase Soy Agar" ou Ágar Soja Tripticase
TSAYE	Ágar Soja Tripticase suplementado com Extrato de Levedura
UFC/g ou UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por grama ou mililitro
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
VRBA	"Violet Red Bile Agar" ou Ágar Bile Vermelho Violeta

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* NO DESEMPENHO DE BEZERROS DA RAÇA HOLANDESA

RESUMO – O presente trabalho objetivou caracterizar um isolado de *Bacillus subtilis* para utilização como agente probiótico para bovinos. Foram determinadas "in vitro" a capacidade e o tipo de efeito inibitório do isolado de *B. subtilis* do produto comercial Biotop® sobre *Salmonella, Escherichia coli* e *Clostridium perfringens,* além de sua estabilidade, viabilidade, resistência a antimicrobianos e potencial de ação em comparação com a Nisina e em combinação com EDTA. Foram avaliados os efeitos da adição do isolado na dieta de 32 bezerros da raça Holandesa, em quatro diferentes tratamentos (controle; 1 g/dia; 2 g/dia e 4 g/dia), sobre o consumo de matéria seca, perímetro torácico, ganho de peso, consistência fecal e incidência de doenças. Também foi realizado um desafio com *E. coli* e monitoramento do "score" de fezes, temperatura retal (°C) e parâmetros sanguíneos. O isolado de *B. subtilis* foi mais eficaz contra *C. perfringens*, principalmente quando associado com a Nisina e EDTA. A adição do probiótico na dieta de bezerros aumentou o consumo de matéria seca, ganho de peso e perímetro torácico. No desafio bacteriano não foram observadas diferenças significativas para presença de *Bacillus* spp. e *E. coli* nas fezes. A análise do "score" de fezes, temperatura retal e parâmetros sanguíneos não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos. O produto avaliado demonstrou resultados satisfatórios quanto aos parâmetros de produção animal, sendo recomendada sua utilização para bezerros lactantes, principalmente na dosagem de 4 g/animal/dia.

Palavras-chaves: aditivo, probiótico, ruminante, sucedâneo, teste de inibição.

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF STRAIN OF *Bacillus subtilis* IN HOLSTEIN FRISIAN CALVES PERFORMANCE

SUMMARY - The present work aimed to characterize an isolated of Bacillus subtilis to be used as a probiotic for calves. Were determinate "in vitro" its inhibition capacity and the type of effect of the isolated, that is present in the commercial product Biotop® against *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. It also was tested its stability, viability, resistance to antibiotics and its potential action in comparison with Nisin and in combination with EDTA. They were appraised the effects of the addition of the isolated in the diet of 32 calves "Holstein Frisian" in four different treatments (control; 1 g/day; 2 g/day and 4 g/day), over the intake of dry matter, thoracic perimeter, gain of weight, faecal consistence and incidence of diarrhoea. Also a challenge was accomplished with *E. coli* and the score of faeces monitored, rectal temperature (°C) and sanguine parameters. The isolated of *B. subtilis* was more effective against *C. perfringens*, mainly when associated with Nisin and EDTA. The addition of the probiotic in the diet of calves increased the dry matter intake, weight enhance and thoracic perimeter. In the bacterial challenge significant differences were not observed in the counting of *Bacillus* spp. and *E. coli* in the faeces. The analysis of the score of faeces, rectal temperature and sanguine parameters didn't demonstrate significant differences between the treatments. The appraised product demonstrated satisfactory results as for the parameters of animal production, being recommended to be use for nursing calves, mainly in the dosage of 4 g/animal/day.

Keyword: addictive, inhibition test , probiotic, ruminant, substitute.

I. INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos para atender as necessidades da população mundial requer uma produção intensiva nos diversos segmentos produtivos, sem descuidar dos aspectos sociais, ambientais e de segurança alimentar.

Nesse sentido, tem-se observado grande tendência mundial na utilização de culturas probióticas para as diversas espécies animais, em lugar dos antibióticos, sendo que a utilização dos probióticos é mais racional, uma vez que estes não deixam resíduos no meio ambiente, na carcaça dos animais e não provocam resistência cruzada no homem.

Conceitualmente, as culturas probióticas são suplementos microbianos que aumentam, de maneira significativa, a digestibilidade e o valor terapêutico dos alimentos. Dentre os diversos gêneros que integram este grupo, destacam-se o *Bifidobacterium, Lactobacillus* e, em especial, o *Bacillus,* onde algumas espécies são capazes de produzir substâncias semelhantes aos antibióticos, chamadas de bacteriocinas.

A utilização de bactérias com capacidade probiótica, como o *Bacillus subtilis,* como aditivo de rações, têm sofrido enormes progressos durante a última década, na seqüência de um conjunto diversificado de trabalhos científicos nas áreas de taxonomia clássica e molecular, terapêutica, análise de diversidade genética, entre as espécies isoladas de um mesmo meio ou de meios diferentes, bem como os possíveis mecanismos de ação de cada espécie (REUTER, 1990).

Nas últimas décadas, a análise de diversas pesquisas, tanto nacionais como internacionais, direcionam sobre uma grande variabilidade e, por vezes inconsistência dos resultados obtidos, quando da utilização dessas substâncias, o que dificulta o estabelecimento, de forma clara e inequívoca, dos reais benefícios à saúde do hospedeiro (GOMES & MALCATA, 2005).

De maneira geral, para que determinada espécie de microrganismo tenha efetividade como agente probiótico, algumas propriedades importantes devem ser consideradas, destacando-se: não ser patogênico; não-invasivo e não-carcinogênico;

ser gram-positivo; ser produtor de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas; excluir ou reduzir a aderência de patógenos; ser tolerante à bile; ser viável, estável e ser espécie-específico (JONES & THOMAS, 1987).

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Probióticos

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”, e tem sido utilizado de maneira diversa ao longo dos últimos anos.

LILLY & STILLWELL (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, observando a ação de microrganismos como promotores de crescimento. Na seqüência, seguiram-se inúmeros trabalhos sobre produtos e processos com o propósito de oferecer proteção contra a infecção por patógenos intestinais e melhores desempenhos zootécnicos. A maioria desses produtos é composta por culturas de microrganismos vivos, com a capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal do hospedeiro. Na seqüência, surgiram várias definições para os probióticos, observando-se a complementação das definições antecessoras, com a adequação a alguma característica peculiar.

FULLER (1989) definiu o termo probiótico como sendo um suplemento alimentar composto de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, através do equilíbrio da microbiota intestinal. HAVENAAR et al. (1992), complementando a definição proposta por FULLER (1989), definiu probióticos como uma cultura pura ou composta de microrganismos vivos que, fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural.

Atualmente, o probiótico para ruminantes é descrito como um suplemento alimentar que contêm microrganismos vivos que produzem efeitos benéficos ao hospedeiro (MOTTA et al., 2006). Dentre os efeitos benéficos, estes produtos estabilizam a população de microrganismos benéficos no trato gastrintestinal, mantendo

o equilíbrio da microbiota intestinal e ruminal, impedindo a colonização intestinal por bactérias patogênicas, melhora da eficiência de utilização de alimentos, além de aumentar a resposta imune humoral (ARENAS et al., 2005).

O acúmulo de informações sobre a composição da microbiota intestinal dos animais, o efeito dos antibióticos sobre esta função e as funções que os microrganismos probióticos podem exercer, mantendo o equilíbrio deste ecossistema, exigem uma conceituação mais precisa para este termo (FERNANDES et al., 2000).

2.1.1. Importância dos Probióticos na Produção Animal

Nos últimos anos, com a intensificação dos sistemas de produção animal, a elevada concentração de animais por unidade de área oferece riscos, cada vez maiores, de disseminação de agentes patogênicos e instalação de processos mórbidos nos animais.

Na tentativa de controlar tais problemas e, ainda, atuar como promotor de crescimento, o uso de antibióticos em ambos os níveis, terapêutico e subterapêutico, tem se tornado difundido (SANTOS & TURNES, 2005). Entretanto, segundo VASSALO et al. (1997), os antibióticos e quimioterápicos tradicionalmente utilizados, muitas vezes, mostram-se ineficazes no controle de desordens intestinais provocadas por microrganismos patogênicos, pois se verifica uma tendência à resistência, como conseqüência do uso freqüente de alguns princípios ativos.

Além disso, a possibilidade de que o uso de aditivos antimicrobianos na dieta induza à seleção de bactérias patogênicas para o homem e de animais resistentes a antibióticos e quimioterápicos tem levado a restrição do seu uso em muitos países importadores de carne (Europa, América do Norte e Ásia) (ÁVILA, 2007). Nestes países, antibióticos como Monensina Sódica, Lasalocida Sódica, Salinomicina e Virginiamicina deixaram de ser utilizados na produção de bovinos de corte e leite, em virtude da possibilidade de acúmulo de resíduos nos produtos de origem animal (carne, leite e derivados), bem como no meio ambiente (GRAMINHA et al., 2007).

Com as restrições impostas pela União Européia, os produtores europeus atualmente podem recorrer a um numero limitado de promotores de crescimento. No Brasil, os produtos que foram utilizados no passado encontram-se, atualmente, proibidos como aditivos de rações, incluindo: Tetraciclinas, Penicilinas, Cloranfenicol, Sulfonamidas Sistêmicas, Furazolidona, Nitrofurazona e Avoparcina (MENTEN, 2001). Tais medidas geraram conseqüências econômicas negativas em sete países da Comunidade Européia, uma vez que o prejuízo causado pela proibição do uso de antimicrobianos foi da ordem de US$ 1,103 bilhões na cadeia da carne suína, sendo 58% deste custo absorvido pelos produtores (BUTOLO, 1990).

Entre os principais promotores de crescimento alternativos aos agentes antimicrobianos estão os probióticos, que propiciam desempenho zootécnico similar aos obtidos pela administração de antibióticos, tendo, entretanto, a vantagem de não causar resistência bacteriana no hospedeiro, danos ambientais e segurança alimentar na sua utilização (FOX, 1988).

2.1.2. Sistemática de Ação dos Probióticos

Os mecanismos de ação dos probióticos sobre as bactérias patogênicas não estão inteiramente elucidados, entretanto, a utilização de culturas probióticas em ruminantes jovens pode auxiliar no desenvolvimento do rúmen e no estabelecimento da microbiota nativa, melhorando o ganho de peso e reduzindo a ocorrência de diarréia causada por bactérias patogênicas (CEPELJNIK et al., 2003; EWASCHUK et al., 2004). Especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal. O equilíbrio entre os diferentes componentes da microbiota intestinal parece ser fundamental para o funcionamento normal e saudável da função digestiva e geral do hospedeiro.

As principais atividades da microbiota intestinal compreendem a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de adesão ou nutrientes presentes em quantidades limitadas, impedindo sua ação transitoriamente (CROSS, 2002). A exclusão competitiva explica a necessidade da administração

continuada e a elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos (COPPOLA & GIL TURNES, 2004).

Os probióticos também podem elaborar metabólitos que inibem a multiplicação de microrganismos patogênicos, através da síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (FULLER, 1992; JIN et al., 2000; OGAWA et al., 2001).

Conceitualmente, as bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos de baixo peso molecular, sendo produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, que apresentam espectro de ação variado (RUSSEL & MANTOVANI, 2002). As bacteriocinas atuam primariamente sobre a membrana plasmática bacteriana, formando poros que possibilitam o efluxo de componentes citoplasmáticos e causam perda da viabilidade celular (MOLL et al., 1999). Algumas bacteriocinas já foram identificadas e caracterizadas em bactérias do rúmen, sugerindo que o antagonismo microbiano seja importante nas relações do ecossistema ruminal (MANTOVANI et al., 2001). Sendo substâncias mais efetivas contra bactérias gram-positivas, a ação antimicrobiana desses peptídeos se assemelha à dos antibióticos ionóforos (RUSSEL & MANTOVANI, 2002).

CALLAWAY et al. (1997) verificaram que a Nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, possuía efeito inibitório sobre a produção de amônia a partir do hidrolisado protéico. Mais recentemente, demonstrou-se que a bateriocina ruminal Bovicina HC5 produzida por *Streptococcus bovis* HC5 inibiu a produção de amônia por culturas puras de *Clostridium aminophilum* e a produção de metano “in vitro”, por culturas mistas de microrganismos do rúmen (LEE et al., 2002). Esses resultados indicam que as bacteriocinas podem ser utilizadas “in vivo” como aditivo para manipular a fermentação ruminal (RUSSEL & MANTOVANI, 2002).

Os ácidos orgânicos apresentam-se, também, como alternativa para melhorar o desempenho animal. Em nível ruminal, os ácidos orgânicos podem aumentar a utilização de lactato no rúmen, diminuir a perda de equivalentes de redução para produção de metano ou servir como precursores metabólicos para a síntese de glicose (JALC et al., 2002). Em animais não ruminantes, a produção de ácido lático e acético, pelas bactérias utilizadas como probióticos, reduz o pH do ambiente do trato

gastrintestinal, prevenindo o crescimento de vários patógenos e permitindo o desenvolvimento de espécies desejáveis (KLAENHAMMER, 1982).

De acordo com SAXELIN et al. (2005), os probióticos também podem atuar afetando o sistema imune, reforçando a barreira da mucosa e suprimindo as inflamações intestinais. Esse efeito pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos do probiótico interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN & HOLGADO, 2000). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002).

Considerando os potenciais efeitos benéficos dos probióticos sobre a saúde e a produtividade animal, mais estudos devem ser realizados visando isolar culturas potencialmente probióticas, adaptadas ao trato gastrintestinal do animal ruminante e de forma a elucidar os reais efeitos dessas culturas sobre o animal hospedeiro (MANTOVANI, 2006).

2.2. *Bacillus subtilis* – Características Gerais, Importância na Utilização como Probiótico e Produção de Bacteriocinas

O *Bacillus subtilis* é um bastonete Gram-positivo, aeróbio facultativo, não patogênico, produtor de ácido acético, formador de esporos, podendo ser frequentemente isolado no solo (MAZZA, 1994). A principal vantagem da elaboração dos probióticos compostos por *Bacillus,* em comparação com aqueles compostos por bactérias ácido láticas, reside na sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior sobrevivência durante o trânsito ruminal (HOA et al., 2000). Além disso, estes microrganismos se multiplicam em taxa mais rápida do que a de passagem gastrintestinal, ou seja, movimentação freqüente dos conteúdos ruminal e intestinal (peristaltismo) (DJOUVINOV & TODOROV, 1994).

Atualmente, o *Bacillus subtilis* tem sido utilizado na bacterioterapia oral e bacterioprofilaxia de desordens intestinais. A ingestão de quantidades significantes de *B. subtilis* restabelece a flora microbiana normal, principalmente após uso prolongado de antibióticos ou em condições de prevalência de diarréia (HOA et al., 2000). Preparações de probióticos de *B. subtilis* são comercialmente vendidos na maioria dos países europeus, embora ainda seja pouco compreendido seu benefício terapêutico (MAZZA, 1994).

O efeito dessas preparações no desempenho de animais adultos foi demonstrado por MCGILIARD & STALLINGS (1997) que utilizaram um suplemento contendo *A. orizae, B. subtilis*, *L. acidophilus* e cultura de fungos (*S. cerevisiae*), na quantidade de 21,2 g/vaca/dia, em 45 rebanhos (3.417 vacas) do Estado da Virgínia - EUA. Os autores observaram aumento na produção de leite em 31 rebanhos, sendo que em 07 de forma significativa e o teor de gordura diminuiu 0,10%.

Algumas espécies de *Bacillus* são produtoras de substâncias estruturalmente semelhantes aos antibióticos, conhecidas como bacteriocinas. Capazes de inibir ou matar uma grande variedade de outros microrganismos. Algumas bacteriocinas produzidas já foram identificadas e caracterizadas. Particularmente, a Subtilina, uma das bacteriocinas produzidas pelo *Bacillus subtilis* e descoberta por Dirmick & colaboradores em 1947, é estável em ambientes ácidos e possui resistência térmica suficiente para suportar a tratamentos de 121^{o}C, durante 30 a 60 minutos. Concentrações entre 2 a 20 ppm em alimentos enlatados são suficientes para evitar o crescimento de endósporos germinativos. Entretanto, esta substância não é utilizada no tratamento de humanos ou animais, nem como aditivo em rações. Este antibiótico pode ser tão eficiente quanto outro estruturalmente semelhante, contudo, tem recebido pouca atenção.

Geralmente, as bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos com natureza química, modo de ação e especificidade variáveis. Diferem ainda em relação ao espectro de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos (KLAENHAMMER, 1993). De acordo com este autor, as bactericiocinas foram divididas em quatro classes. Grupo I - conhecida como Lambiótico que são moléculas produzidas

no ribossomo como pré-peptídeos que sofrem modificação pós-tradução para formar peptídeos biologicamente ativos; Grupo II - engloba peptídeos termoestáveis e lineares; Grupo III - formada por grandes moléculas termolábeis e Grupo IV - engloba proteínas complexas.

A Subtilina, produzida por *B. subtilis* (5 anéis de Lantionina), está representada no Grupo I dos Lambióticos, assim como a Nisina (MONTIVILLE et al., 2001). Outra característica importante é a capacidade do *B. subtilis* estimular a resposta imune dos animais e serem utilizados como imunomoduladores. Diversas pesquisas "in vitro" e "in vivo" demonstraram o estímulo na secreção de Imunoglobulina A.

BELIAVSKAIA (2001) demonstraram que o *B. subtilis* recombinante evitou a imunossupressão causada pela vacinas vivas atenuadas contra Parvovirus e Cinomose em cães, acelerando a formação de clones de memória e aumentando a resposta imune específica devido à ação do interferon $\alpha 2$ secretado no interior do lúmen intestinal. CONCEIÇÃO et al. (2002) demonstraram que um determinado probiótico comercial estimulou a resposta imune humoral a uma bactéria de *Escherichia coli* em camundongos e COPPOLA et al. (2004) comprovaram que este probiótico aumentou significativamente a resposta imune de camundongos a uma vacina viva atenuada de Parvovirus canino.

GONÇALVES et al. (2007), investigaram um probiótico composto por *B. cereus* (ATCC 9634) e *B. subtilis* (CCT 3131) capaz de estimular a resposta imune em cães vacinados contra os *Sorovares canicola* e *Icterohaemorrhagiae* de bactérias do gênero *Leptospira*.

Além dessas propriedades, o *Bacillus subtilis* possui atividade secretora de enzimas proteolíticas, aminolíticas, lipolíticas e fibrolíticas, auxiliando na digestão de certos tipos de substratos (JENSEN & JENSEN,1992).

2.3. Efeito de Probióticos em Bezerros

As bactérias presentes no intestino dos bezerros são importantes para manter a integridade da mucosa intestinal e, assim, permitir maior absorção dos nutrientes

digeridos. Uma vez na corrente sanguínea, esses nutrientes serão utilizados para o crescimento dos animais. A função principal dessas bactérias, reconhecidamente benéficas, é impedir que bactérias patogênicas se estabeleçam no intestino, ou diminuir a quantidade destas últimas.

Neste sentido, é fundamental que os animais estejam saudáveis. Em geral, eles devem apresentar um bom funcionamento do aparelho intestinal garantindo o equilíbrio da sua microbiota e, conseqüentemente, com reflexo marcante na utilização de nutrientes e para melhorar o desenvolvimento ou mesmo para incrementar a produção.

Por outro lado, o aparente equilíbrio do aparelho intestinal pode ser interrompido, como naquelas ocasiões em que ocorre o estresse animal, em virtude das agressões decorrentes do manejo, variações climáticas ou alimentação errônea. Este desequilíbrio pode oferecer condições favoráveis para a proliferação de bactérias patogênicas, provocando doenças infecto-contagiosas, dentre as quais a diarréia (FULLER, 1989). Neste momento crucial é que os probióticos podem auxiliar através da promoção do balanço da microbiota intestinal de bezerros.

Como já descrito anteriormente, os principais efeitos benéficos dos probióticos podem ser mediados por um efeito antagônico direto contra grupos específicos de microrganismos, resultando na redução de suas células viáveis, através da produção de compostos antibacterianos, competição por nutrientes ou por sítios de adesão no intestino. E, ainda podem ter efeitos sobre o metabolismo microbiano, aumentando ou diminuindo a atividade enzimática, ou ainda pela estimulação da imunidade, aumentando os níveis de anticorpos ou a atividade dos macrófagos (FULLER, 1989).

GONÇALVES et al. (2007) avaliaram o efeito do probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis* e *Bifidobacterium lifidem* e não encontraram respostas no ganho de peso diário, na altura da cernelha e na ocorrência de diarréia nos bezerros da raça Holandesa.

ZANETTI (1999) verificaram em bezerros que receberam leite com antibiótico ou com probiótico obtiveram ganho de peso semelhante, mas superior à testemunha, e a conversão alimentar foi melhor no tratamento com probiótico. A incidência de diarréia,

nos 60 dias de experimento, foi de apenas 1,75; 1,50 e 2,08 dias, para os animais tratados com probióticos, antibióticos e a testemunha, respectivamente.

MEYER et al. (2001) trabalharam com 79 bezerros da raça Holandesa que receberam dieta líquida, composta por leite integral a partir do 3º dia de vida, ou sucedâneo do leite a partir do 3º dia ou sucedâneo a partir do 15º dia de vida, com ou sem adição do probiótico, composto por *Lactobacillus acidophilus, Enterococus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae.* Os autores verificaram que o probiótico foi efetivo em promover maior ganho de peso nos animais que receberam sucedâneo do leite a partir do 3º dia de vida em comparação com o tratamento sem adição da cultura probiótica. Nos demais tratamentos, o probiótico não apresentou resultados que justifiquem sua utilização na dieta dos animais.

ARENAS et al. (2007) trabalharam com 108 bezerros da raça Nelore em regime de pastagens e verificaram que a adição de probiótico, composto por enzimas em associação com *Lactobacillus acidophilus, Estreptococus faecium, Bifidobacterium thermophilum e Bifidobaterium longum,* promoveram 33,28% a mais de ganho de peso quando comparado com o grupo controle.

CRUYWAGEN et al. (1996) avaliaram o efeito do probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) sobre o ganho de peso, eficiência alimentar e consistência fecal de 40 bezerras Holandesas alimentadas com sucedâneo do leite e ração comercial (18% PB) e verificaram que o probiótico não foi efetivo em promover aumento no ganho de peso, na eficiência alimentar e na melhoria da consistência das fezes.

GORGULU et al. (2003) testaram o efeito do probiótico sobre o ganho de peso e estado sanitário de 20 bezerras da raça Holandesa. O probiótico era composto por *Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. rhamnosus, Bifidobaterium bifidum, Streptococus thermophilus, Enterococus faecium, Aspergillus oryza* e *Cândida pintolopesii*. Os autores observaram que o probiótico melhorou em 4,85% o ganho de peso das bezerras e também o estado sanitário das mesmas.

CHAVES et al. (1999) mensuraram o efeito do probiótico contendo *Lactobacillus acidophillus* sobre o consumo de matéria seca e ganho de peso em 36 bezerros, sendo 33 mestiços Holandês-Zebu e 03 da raça Holandesa, do nascimento aos 56 dias de

idade. Os autores concluíram que os tratamentos com inclusão do probiótico não influenciaram significativamente os parâmetros avaliados.

2.3.1. Descrição das Bactérias Patogênicas que Frequentemente acometem Bezerros

2.3.1.1. *Clostridium perfringens*

Conceitualmente, enterotoxemia é um termo aplicado a um grupo de infecções entéricas dos ruminantes, sendo um processo resultante da absorção de toxinas produzidas principalmente pelo *C. perfringens* no trato intestinal. Condições predisponentes são necessárias para a produção de toxinas, como mudança drástica na alimentação, voracidade e sobrecarga alimentar. Essas condições associadas às mudanças na microflora ruminal com passagem de alimentos não digeridos para o intestino delgado produzem meio favorável para o rápido crescimento do agente e produção de toxinas (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000).

A enterotoxemia é uma doença aguda não-contagiosa, com início súbito, e apresenta necrose confluente do intestino delgado, que, em infecções subclínicas, provoca redução na absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, menor ganho de peso e piora na conversão alimentar. Acomete principalmente animais entre três dias e seis meses de idade (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000). Entretanto, a doença tem sido descrita em animais adultos (KEAST & BARRON, 1954; ITODO et al., 1983; SIGURDARSON & THORSTEINSSON, 1990; SILVEIRA et al., 1995). Na região centro-oeste do Brasil, a doença é diagnosticada com maior intensidade em bovinos adultos, sendo *C. perfringens* tipo D o mais freqüentemente envolvido no processo.

Devido à alta letalidade e às características ecológicas do agente, sendo ubiquitários do trato intestinal dos animais e do solo e pela forma de resistência na natureza através de esporos, a erradicação das enfermidades causadas pelos clostrídeos é praticamente impossível. O controle e a profilaxia devem basear-se em

medidas adequadas de manejo, vacinação de todo o rebanho com imunógenos eficientes e controles biológicos, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as enfermidades (SILVEIRA et al., 1995).

2.3.1.2. *Escherichia coli*

Dentre as diversas espécies de microrganismos patogênicos, a *Escherichia coli*, pertencente ao grupo das Enterobactérias, é capaz de produzir potentes toxinas, dentre elas a "Shiga-like" que causa danos à parede do intestino do hospedeiro.

A *E. coli,* classificada como bastonete Gram-negativo, é o microrganismo aeróbio mais comum no trato gastrintestinal dos homens e de muitos outros animais (KUNTZ & KUNTZ, 1999). Contudo em anos recentes a *E. coli* tem sido reconhecida como uma espécie patogênica causadora de doenças intestinais. Existem as *E. coli*: Enteropatogênicas (EPEC), Enterotoxigênicas (ETEC), Enteroenvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroaderentes-agregadas (EA-AggEC), sendo que *E. coli* enterohemorrágica é causadora de dois tipos de enfermidades graves: colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (HUS) (VARNAM e EVANS, 1991; KUNTZ, 1999).

2.3.1.3. *Salmonella spp.*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, e seus mais de 2.500 sorotipos diferenciam-se bioquímica e sorologicamente, sendo agrupadas de acordo com seus antígenos somáticos principais. São bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, não encapsulados, sorologicamente relacionados, anaeróbios facultativos e normalmente móveis. Podem sobreviver e multiplicar-se facilmente no meio ambiente, sendo este um fator importante na transmissão da doença. São, no entanto, bastante susceptíveis ao calor e a maioria dos desinfetantes (PELCZAR et al.,1996).

A Salmonelose ou paratifo é provocada por bactérias do gênero *Salmonella spp*. Há uma forte tendência de ocorrer paratifo durante a segunda ou terceira semana de vida de bezerros, mais do que na primeira semana, característica mais comum na Colibacilose. Os sintomas são fezes moles, fétidas, às vezes com estrias de sangue; febre na fase inicial, podendo ocorrer, posteriormente, hipotermia, inapetência, depressão, orelhas caídas, desidratação, emagrecimento rápido e traseiro sujo (cauda e região perineal). A diarréia pode provocar o aparecimento de pneumonia formando um quadro denominado de pneumoenterite.

2.4. Outras Substâncias Orgânicas que Inibem a Multiplicação de Microrganismos

2.4.1. EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

A membrana externa das bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, é uma bicamada de membranas que se forma externamente à parede celular e está unida ao peptidoglicano por uma camada semicontínua de pequenas moléculas lipoprotéicas. Em sua face interna a membrana externa contém glicerofosfolípideos e, em sua face externa, moléculas de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é composto de uma parte lipídica (lipídeo A) e de um heteropolissacarídeo complexo, com caráter parcialmente aniônico. O LPS une-se à superfície hidrofílica da parede celular constituindo-se numa barreira para substâncias hidrofóbicas e macromoléculas (NIKAIDO, 1996).

De acordo com HANCOCK (1997), o lipídeo A insere-se na membrana e em muitos Gram-negativos compõe-se de difosfato de diglucosamina com 5 a 7 ácidos graxos ligados a uma região de 8 a 12 açúcares e 3 a 8 resíduos de fosfato associados com o antígeno “O”, que consiste de 3 a 5 unidades repetidas de açúcares. Para bactérias que não possuem este antígeno, o LPS é chamado lipo-oligossacarídeo.

Em resumo, os componentes mais importantes da estrutura da membrana externa de bactérias Gram-negativas são as porinas e o LPS, sendo que este possui cargas negativas e superfície externa poliônica, principalmente neutralizada por cátions divalentes de Mg^{2+} e Ca^{2+} (HANCOCK, 1997).

A presença de quelantes altera a estrutura da membrana externa, pois estes compostos são capazes de seqüestrar íons metálicos divalentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas e formar complexos estáveis. Como conseqüência, ocorre à alteração da permeabilidade (VAARA, 1992), tornando a célula sensível a determinadas substâncias, como bacteriocinas. (HELANDER & MATTILA-SANDHOLM, 2000).

O EDTA é um agente quelante que faz remoção de íons bivalentes a partir de sítios de ligação no LPS. Cerca de 30 a 50% de LPS e outros lipídeos e proteínas são liberados da membrana externa, após o tratamento com EDTA. Como conseqüência, torna-se permeável a compostos hidrofóbicos (HELANDER et al., 1997).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Avaliar "in-vitro" o potencial de ação do isolado de *Bacillus subitilis* do produto Biotop®, como potencial probiótico para bovinos, contra cepas de *E. coli*, *Salmonella spp.* e *C. perfringens*.
- Avaliar "in vivo" o efeito do isolado de *Bacillus subtilis* sobre os parâmetros de consumo, desempenho e resistência de bezerros da raça holandesa.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar microbiologicamente o *Bacillus subtilis* (Biotop®) para utilização como agente probiótico para bovinos;
- Determinar a capacidade inibitória e espectro de ação do isolado de *B. subtilis* sobre bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* e bactérias Gram-positivas, como *Clostridium perfringens;,*
- Detectar e caracterizar o tipo de efeito inibitório pelo agente probiótico;
- Determinar a estabilidade e viabilidade das cepas;

- Verificar o potencial de ação do isolado de *B. subtilis* em comparação com a Nisina (Nisaplin® - Danisco, Inglaterra) na inibição da multiplicação de cepas de *E. coli, Salmonella* spp. e *C. perfringens*, em combinação com EDTA. Os testes foram realizados separadamente na forma de tratamentos.
- Verificar a sensibilidade antimicrobiana do isolado de *B. subtilis* a determinados antibióticos utilizados no tratamento de desordens intestinais.
- Estudar efeitos da adição do probiótico na dieta de bezerros da raça Holandesa, sobre o consumo de matéria seca, perímetro torácico, desempenho, consistência fecal e incidência de doenças.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento 1

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, pertencente ao Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP/FCAVJ.

Para tanto, foi utilizado um isolado de *Bacillus subtilis* do produto Biotop®. Após o crescimento da cepa em questão, as mesmas foram confrontadas em duplicata com estirpes patogênicas, como: *Escherichia coli* isolado de carcaça bovina produtora de toxina shiga; *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* isolados de bovinos, com diagnóstico positivo para as respectivas toxinfecções, pelo Laboratório de Anaeróbios da FCAV/UNESP. Essas estirpes freqüentemente acometem bezerros desencadeando um processo de diarréia. Além disso, foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* (American Type Culture Collection - ATCC 25922) controlada e aprovada por órgãos regulamentadores para testes de potência de antibióticos, como controle “comparativo” com as estirpes supracitadas. Vale ressaltar que todos os testes foram realizados em duplicata.

4.1.1. Viabilidade e Enumeração dos Microrganismos Utilizados "in vitro"

4.1.1.1. *Bacillus subtilis*

O teste de viabilidade do *Bacillus subtilis* no produto Biotop®, que se apresentava esporulado e liofilizado, foi realizado através de reativação em caldo BHI ("Brain Heart Infusion" - Oxoid®) por 18 horas à 37°C. Posteriormente, o mesmo foi isolado em ágar Nutriente ("Nutrient Agar"-Oxoid®) suplementado com gema de ovo, para realização dos testes subseqüentes.

Os níveis populacionais foram confirmados através da semeadura do isolado de *B. subtilis* em caldo BHI (Oxoid®) e incubação por 24 horas à 37°C. Durante este período, nos tempos 0 (inicial), após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de incubação, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas para enumeração (Unidades Formadoras de Colônias por mL – UFC/mL) em placas de ágar NA (Oxoid®) e incubadas à 37°C durante 24 horas.

Ressalta-se que em cada etapa do processo foi confirmado o microrganismo utilizado pelo método de coloração de Gram.

4.1.1.2. *Escherichia coli*

Para verificação da viabilidade da estirpe de *E. coli* patogênica foi realizada a inoculação da mesma em caldo BHI (Oxoid®) com incubação à 37°C por 18 horas. Após verificação do crescimento bacteriano, foi realizado o isolamento em ágar seletivo VRBA ("Violet Red Bile Agar" - Oxoid®) com incubação em aerobiose por 24 horas à 37°C. Posteriormente foram verificadas as características de crescimento das colônias nesse meio de cultura e confirmação por coloração pelo método Gram.

Os níveis populacionais foram confirmados através da inoculação da estirpe de *E. coli* em caldo BHI (Oxoid®) e incubação por 24 horas à 37°C. Durante este período, nos tempos 0 (inicial), após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de incubação,

alíquotas de 1,0 mL foram retiradas para enumeração (UFC/mL) em placas de ágar VRBA (Oxoid®) e incubadas à 37°C durante 24 horas.

Os mesmos procedimentos descritos acima foram adotados para a cepa de *E. coli* (ATCC 25922).

4.1.1.3. *Clostridium perfringens*

A análise de viabilidade da estirpe de *C. perfringens* foi realizada mediante a inoculação em caldo BHI (Oxoid®) com incubação à 37°C por 18 horas. Após verificação do crescimento bacteriano, foi realizado o isolamento da bactéria em ágar seletivo SPS (Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina - Oxoid®), com incubação em jarras de anaerobiose com sistema GasPack® por 24 horas à 37°C. Posteriormente foram verificadas as características de crescimento no respectivo meio de cultura e a confirmação pelo método de coloração Gram.

Os níveis populacionais foram confirmados através da inoculação da estirpe em caldo BHI (Oxoid®) e incubação por 24 horas à 37°C. Durante este período, nos tempos 0 (inicial), após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de incubação, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas para enumeração (UFC/mL) em placas de ágar SPS (Oxoid®) e incubadas em jarras de anaerobiose com sistema GasPack® à 37°C durante 24 horas.

4.1.1.4. *Salmonella* spp.

Para verificação da viabilidade da estirpe de *Salmonella* foi realizada a inoculação em caldo BHI (Oxoid®) com incubação à 37°C por 18 horas. Após verificação do crescimento bacteriano, foi realizado o isolamento em ágar seletivo MC ("Mac-Conkey" - Oxoid®) com incubação em aerobiose por 24 horas à 37°C. Posteriormente, foram verificadas as características de crescimento das colônias no meio de cultura em questão e a confirmação realizada por coloração pelo método Gram.

Os níveis populacionais foram confirmados através da inoculação da estirpe de *Salmonella* em caldo BHI (Oxoid®) e incubação por 24 horas à 37°C. Durante este período, nos tempos 0 (inicial), após 2 horas, após 4 horas e após 6 horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL para enumeração (UFC/mL) em placas de ágar MC (Oxoid®) e incubadas à 37°C durante 24 horas.

4.1.2. Detecção da Atividade antimicrobiana do *Bacillus subtilis*

4.1.2.1. Teste de Inibição

Para o teste de inibição foi utilizado o método de dupla camada, de acordo com a metodologia descrita por MAIA et al., (2001). Foi utilizado um inóculo de 10^6 UFC/mL, determinado a partir da turbidez pela escala de MacFarland, de cada amostra *de B. subtilis.* Estes inóculos foram preparados em caldo BHI (Oxoid®) e incubados à 37°C por 18 horas. Posteriormente, foram adicionados em cinco pontos eqüidistantes na superfície de uma placa de ágar NA (Oxoid®) e incubados por 24 horas à 37°C. Após incubação, as bactérias foram inativadas por exposição ao clorofórmio por 20 minutos. Decorrido o período correspondente, as placas foram abertas para permitir a evaporação do clorofórmio. Na seqüência, procedeu-se a incorporação de uma outra camada de 3,5 mL de ágar BHI semi-sólido (contendo somente 0,75% de ágar - Oxoid®).

O ágar BHI foi inoculado previamente com 0,1 mL de uma cultura de 18 horas com 10^6 UFC/mL, determinado a partir da turbidez pela escala de MacFarland das amostras antagonistas de *E. coli, Samonella, E. coli* (ATCC 25922) e *C. perfringens.* As placas foram incubadas à 37°C por 24 a 48 horas em aerobiose e anaerobiose, respectivamente e, então, avaliadas para presença ou ausência de zonas de inibição de crescimento (MAYR-HARTING et. al., 1972; TAGG et al., 1976).

4.1.2.2. Caracterização do Efeito Inibitório

O mecanismo antagonista foi realizado de acordo com uma adaptação do método descrito por PILET et al. (1995) que utiliza os sobrenadantes das culturas. Assim, foi estudado o mecanismo antagonista, cultivando os isolados selecionados em caldo NA e BHI (Oxoid®), os quais foram incubados à 37°C durante 16 a 18 horas. Posteriormente, foram centrifugados 10 mL de cada cultura durante 20 minutos a 4.000 r.p.m. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em filtros com 0,2 mm de diâmetro de porosidade (Millex - Millipore®). Foram, então, preparadas quatro misturas do sobrenadante filtrado para caracterizar o efeito inibitório, mediante a realização dos seguintes ensaios:

- Ensaio 1 (E1) – foi adicionado catalase (Sigma®) em Tampão Fosfato de Sódio (pH 7) (0,2 M) (concentração final de 500 UI/mL) à 1mL do sobrenadante filtrado. Esta mistura foi incubada durante 30 minutos à 30ºC;

- Ensaio 2 (E2) – foi neutralizado o pH de uma fração do sobrenadante filtrado com NaOH 1 M.

- Ensaio 3 (E3) - 1mL do sobrenadante filtrado, com pH neutralizado, foi tratado com catalase (E1+E2);

- Ensaio 4 (E4) - ensaio realizado diretamente a partir do sobrenadante filtrado sem qualquer outro tratamento (ensaio em branco).

Estas misturas foram inoculadas em poços no ágar Soja Tripticase (TSA - Oxoid®) suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (Oxoid®) (TSAYE), previamente inoculado com 1% de uma cultura de 18 horas de *E. coli, Samonella, E. coli* (ATCC 25922) e *C. perfringens*, separadamente, e incubadas em aerobiose (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp.) e anaerobiose (*Clostridium perfringens*) por 18 a 24 horas à 37°C. Os resultados foram avaliados de acordo com a formação de halos de inibição em cada ensaio testado.

4.1.3. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

O teste foi realizado através do método de difusão em ágar, seguindo a técnica padrão (NCCLS, 2003) descrita originalmente por BAUER et al., 1966.

Foi utilizada uma suspensão de *B. subtilis* em caldo BHI (Oxoid®) com densidade de aproximadamente 0,5; sendo ajustada pela escala de Mac Farland. Com o auxílio de "swabs" esta suspensão foi plaqueada em ágar Muller-Hinton (Oxoid®). Na seqüência, discos impregnados com os antibióticos Tetraciclina (30 µcg), Estreptomicina (10 µcg), Trimetoprima (5 µcg), Cotrimoxazol (25 µcg), Norfloxacina (10 µcg) e Doxiciclina (30 µcg) foram adicionados separadamente na placa recém inoculada e, então, incubadas por 18 horas à 37°C. Decorrido este tempo, foram mensurados os diâmetros dos halos de inibição. As medidas obtidas foram correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes à diversos agentes antimicrobianos.

Para o *Bacillus* spp. a técnica supracitada ainda não apresenta resultados suficientes para interpretação. Desta forma, as medidas foram especuladas correlacionando com as CIM de outras cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos.

4.1.4. Determinação do Efeito de Outras Substâncias Antimicrobianas sobre a Multiplicação de *Escherichia coli, Escherichia coli* (ATCC 25922)*, Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* em Combinação de *Bacillus subtilis* ou Nisina

4.1.4.1. Determinação do Efeito do EDTA:

O efeito do EDTA foi avaliado nas seguintes condições:

A) *Clostridium perfringens:*

- Tratamento 1: Sobre *C. perfringens* isoladamente;
- Tratamento 2: Sobre *C. perfringens* e Nisina (100 U.I./mL);

- Tratamento 3: Sobre *C. perfringens* na presença de *B. subtilis;*

B) *Escherichia coli:*

- Tratamento 1: Sobre *E. coli* isoladamente;
- Tratamento 2: Sobre *E.coli* e Nisina (100 U.I./mL);
- Tratamento 3: Sobre *E. coli* na presença de *B. subtilis;*

C) *Escherichia coli* ATCC 25922:

- Tratamento 1: Sobre *E. coli* isoladamente;
- Tratamento 2: Sobre *E.coli* e Nisina (100 U.I./mL);
- Tratamento 3: Sobre *E. coli* na presença de *B. subtilis;*

D) *Salmonella* spp.:

- Tratamento 1: Sobre *Salmonella* spp. isoladamente;
- Tratamento 2: Sobre *Salmonella* spp. e Nisina;
- Tratamento 3: Sobre *Salmonella* spp. na presença de *B. subtilis.*

Para verificar o efeito do EDTA sobre a multiplicação de *E. coli, E. coli* ATCC 25922*, Salmonella* spp. e *C. perfringens*, foram preparados "erlenmeyers" contendo 100mL de caldo BHI adicionado de EDTA na concentração de 20mM. Alíquotas de 1mL de uma suspensão dos microrganismos *E. coli, E. coli* ATCC 25922*, Salmonella* e *C. perfringens,* de acordo com os tratamentos*,* separadamente, com concentração de 10^7 UFC/mL, foram transferidas para os frascos de "erlenmeyes" em duplicata. Também foram preparados frascos contendo meio BHI sem EDTA como tratamento controle. Os frascos foram incubados à 37^{o}C em aerobiose (*E. coli, E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella*) ou anaerobiose *(C. perfringens*) com freqüentes agitações. Em intervalos regulares, até o limite de 7 horas, foram retiradas alíquotas de cada frasco para semeadura em ágar BHI (*E. coli)*, MC (*Salmonella)* e SPS (*C. perfringens)*, em

duplicatas. As placas foram incubadas à 37^{o}C em aerobiose (*E. coli* e *Salmonella*) ou anaerobiose *(C. perfringens).*

Realizaram-se contagens das colônias nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/mL.

4.2. Experimento 2

4.2.1. Avaliação da Eficiência do Probiótico no Consumo de Matéria Seca, Perímetro Torácico, Desempenho, Consistência Fecal e Incidência de Doenças em Bezerros da Raça Holandesa

4.2.1.1. Local, Animais, Instalações e Manejo Sanitário

O experimento foi conduzido nas dependências do Departamento de Zootecnia da FCAV-UNESP – Jaboticabal, durante o período de 16 de julho a 21 de outubro de 2007, totalizando 97 dias.

Foram utilizados 32 bezerros machos não castrados da raça holandesa, variedade preta e branca (HPB), com peso médio de 38,60 kg. Os animais, após o nascimento, foram separados de suas mães e imediatamente transportados para as instalações experimentais. Na chegada, os animais foram pesados em balança eletrônica, de forma a se obter o peso inicial (kg), sendo mensurados com fita métrica os perímetros torácicos. Posteriormente, os animais foram identificados com brincos plásticos numerados e distribuídos em quatro diferentes tratamentos.

Na seqüência, os animais foram submetidos ao corte e desinfecção do umbigo, seguido da aplicação de 1 mL de Ivermectina e 1 mL de Imizol, para controle de endo e ectoparasitos, bem como a prevenção de Tristeza Parasitária. Posteriormente, os animais foram, então, encaminhados às baias experimentais individuais (12 m^2), dotadas de bebedouro e comedouro, conforme demonstrado na Figura 01.

Figura 01. Baia experimental utilizada no experimento.

Em cada baia experimental foi colocada uma camada de bagaço de cana cru, de forma a se permitir um ambiente mais adequado à permanência dos bezerros, principalmente no que se refere ao controle da umidade. Além disso, a cada dois dias as baias eram raspadas e a camada de bagaço renovada, visando à diminuição da umidade do ambiente.

Em relação à pesagem dos animais, esta foi realizada em intervalos de 14 dias, da mesma forma que a quantificação do perímetro torácico (cm) com fita métrica. No entanto, para quantificação do ganho de peso, perímetro torácico e consumo dos alimentos foi considerado somente o período após a adaptação total ao sucedâneo do leite (41 dias). Após isso, as mensurações foram realizadas sistematicamente durante os 56 dias de avaliação, em intervalos regulares de 14 dias.

Para o controle de diarréias que perduravam por mais de 48 horas foi utilizada a intervenção medicamentosa, através da infusão sanguínea de soro glicosado e aplicação intramuscular de antibiótico (Terramicina, Doxiclina ou Sulfato de Neomicina).

4.2.1.2. Dietas Experimentais e Manejo de Alimentação

Nos primeiros onze dias de vida, todos os animais receberam dieta líquida em baldes plásticos individuais, identificados visando a individualização do tratamento e a não infecção dos animais. A dieta foi composta por leite integral (sem resíduo de antibióticos, uma vez que era ordenhado de vacas não tratadas com quimioterápicos), que foi aquecido à 38 ºC para estimular o consumo.

Os animais receberam a dieta liquida na base de 4 litros/dia, sendo a mesma dividida em duas porções iguais de dois litros cada. A dieta líquida foi oferecida em dois horários, especificamente às 8:00 horas da manhã e às 16:00 horas da tarde.

A inclusão do aditivo Biotop®, nos respectivos tratamentos, foi realizada mediante a inclusão do referido produto na dieta líquida. Além disso, foi oferecido aos animais, para consumo *ad libitum,* feno de capim Tifton 85 (Tabela 1).

Quatro tratamentos experimentais foram avaliados, sendo:

Tratamento 1: Controle

Tratamento 2: Controle + 1 g de Biotop® (*Bacillus subtilis* - 10^9 UFC/g)

Tratamento 3: Controle + 2 g de Biotop®

Tratamento 4: Controle + 4 g de Biotop®

O fornecimento de água aos bezerros foi realizado desde o primeiro dia de vida, sendo os bebedouros limpos diariamente.

Decorrido o período de adaptação, os animais passaram a receber sucedâneo do leite (Tabela 1) de forma progressiva, ou seja, substituição de 25%/semana do leite integral, até atingir a substituição total do leite integral, atingindo, assim, 4,0 litros de sucedâneo do leite/animal/dia. É importante ressaltar que o período de transição do fornecimento de leite integral até o consumo total de sucedâneo teve duração de 30 dias.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica do leite integral, sucedâneo do leite, ração concentrada e feno de Tifton 85.

Parâmetros	Leite Integral	Sucedâneo	Ração	Feno
Matéria Seca (%)	12,2	91,5	88,0	89,8
Extrato Etéreo (% MS)	24,3	9,0	0,2	1,4
Proteína Bruta (% MS)	24,6	21,1	25,4	5,2
FDN (% MS)	-	3,1	11,4	78,6
FDA (% MS)	-	2,4	8,7	46,2
Matéria mineral (% MS)	6,1	8,5	16,0	5,1

Figura 02. Recipientes para fornecimento da dieta liquida e da ração concentrada.

A ração concentrada foi fornecida (Tabela 1), a partir do primeiro dia de avaliação experimental, na base de 50 g/animal/dia, aumentando-se a quantidade ofertada diariamente, de acordo com o consumo, tendo como parâmetro de mensuração copos medidores, de forma a se controlar também as perdas. É importante ressaltar que a ração foi fornecida em outro recipiente plástico e não no balde de fornecimento da dieta líquida, da mesma forma que o feno de Tifton 85 (Figura 02).

Decorrido o período de 41 dias do inicio do experimento e com os animais completamente adaptados ao sucedâneo do leite, ao consumo de feno (ao redor 400

g/dia) e ao consumo de ração concentrada (ao redor de 800 g/dia), os animais foram desmamados abruptamente.

Após a desmama, os animais passaram a receber a inclusão do aditivo, de acordo com os tratamentos, juntamente com a ração concentrada, sendo a adição realizada no período da tarde, especificamente às 16:00 horas.

4.2.1.3. Coleta das Amostras e Análises Químico-Bromatológicas

Durante todo o período experimental, amostras dos alimentos (ração concentrada, feno e sucedâneo do leite) foram coletadas quinzenalmente, visando à determinação da composição químico-bromatológica.

As análises químico-bromatológica de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e matéria mineral foram realizadas segundo metodologia descrita por SILVA & QUEIROZ (2002).

O consumo dos alimentos sólidos (ração concentrada e feno) foi quantificado diariamente, através da pesagem das quantidades ofertadas e também da sobra de cada animal.

4.2.1.4. Teste de Desafio Bacteriano e Parâmetros Sanguíneos

Decorrido um período de 92 dias (16/10/2007) do inicio do experimento, condição na qual os animais encontravam-se adaptados à dieta sólida (ração concentrada e feno) e ao manejo de alimentação, 4 animais de cada tratamento foram selecionados através de sorteio, visando a avaliação do desafio bacteriano, mediante a infecção dos mesmos com a estirpe de *E. coli* patogênica.

A partir do dia 16/10/2007, exames de temperatura e fezes foram conduzidos diariamente, sendo que para este último foi adotada a metodologia descrita por LARSON et al. (1997), avaliando-se a aparência física das fezes, com escores de 1 a 4 (1=normais, 2=normais pastosas, 3= diarréia e 4=diarréia profusa), o odor (A=normal,

B=ligeiramente ofensivo e C=altamente ofensivo) e a consistência (1=normal, 2= espumosa, 3= com muco, 4=pegajosa e 5 = um pouco dura).

Para a infecção bacteriana foi utilizada a estirpe de *E. coli* patogênica que foi inoculada em caldo BHI (Oxoid®), com incubação à 37°C por 18 horas (concentração aproximada de 10^9 UFC/mL). Decorrido este período, foram preparadas 16 seringas (1 seringa/animal) contendo 10 mL da cultura bacteriana, de forma a se promover a infecção dos animais. Além disso, foi realizado o teste de coloração de Gram, visando avaliar a presença e identificação do microrganismo nos preparados. A infecção dos animais foi realizada mediante a aplicação oral do preparado de *E.coli*, conforme demonstrado na Figura 03.

Figura 03. Infecção oral dos bezerros com *E. coli* patogênica.

No dia anterior (18/10/2007) e após 72 horas da infecção (21/10/25007) amostras de sangue foram coletadas (Figura 04) em frascos contendo EDTA como anticoagulante, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e imediatamente transportadas ao Laboratório de Análises Clínicas da FCAV/UNESP para análise em aparelho PHA 1/2h. Foram realizadas as análises de hematócrito (HTC), hemoglobina (Hb), contagem de glóbulos vermelhos (CGV), hemoglobina globular média (HGM), concentração hemoglobínica globular média (CHGM), volume globular médio (VGM) e contagem global de leucócitos (GLOBAL).

Figura 04. Coleta sanguínea dos bezerros.

Da mesma forma, nestas datas foram coletadas amostras de fezes (Figura 05), para quantificar (UFC/g de fezes) a população de *E.coli* e de *Bacillus* spp. A coleta foi realizada, assepticamente, em recipientes plásticos estéreis através de estímulo retal e imediatamente transportadas para o laboratório para determinação bacteriológica. Para contagem de *E.coli* e *Bacillus* spp, foram pesados 10 g de fezes e diluídos em 90 mL de solução tampão fosfato estéril (pH 7.2). Partindo-se da diluição inicial foram feitas diluições sucessivas até 10^{-4}. Alíquotas de 1 mL das diluições foram semeadas, em duplicata, pelo método de "pour plate" em placas de petri com adição dos meios NA ("Nutrient Agar" - Oxoid®) e ágar SPS (Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina - Oxoid®) e posterior incubação em aerobiose e anaerobiose (sistema GasPack®), respectivamente, por 24 horas à 37°C. Para confirmação das colônias típicas, os esfregaços destas colônias foram corados pelo método de Gram para observação microscópica.

As contagens foram realizadas com auxílio de um contador de colônias (PELCZAR et al., 1996).

Figura 05. Coleta de fezes dos bezerros.

4.2.1.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Para as análises das variáveis de ganho de peso diário, consumo de matéria seca, conversão alimentar e perímetro torácico foi o utilizado o delineamento em blocos casualizados, utilizando o procedimento GLM do software SAS, (1985). As comparações múltiplas foram realizadas pelo Teste T (Tukey), ao nível de 95% de confiança.

Para a análise dos dados de contagens bacterianas e perfil sanguíneo foi utilizado o delineamento em parcelas subdivididas e as comparações múltiplas foram realizadas pelo Teste T, ao nível de 95% de confiança.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1

Os resultados referentes à viabilidade e enumeração dos microrganismos utilizados podem ser visualizados na Figura 06.

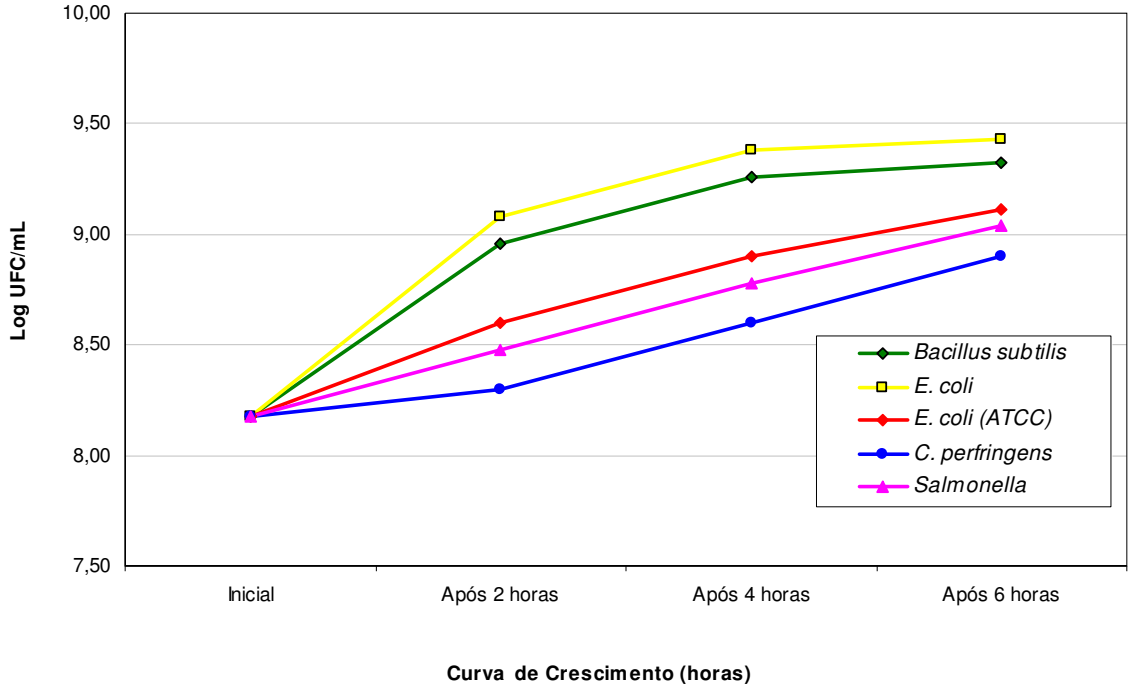

Figura 06. Valores comparativos da taxa de crescimento dos microrganismos utilizados "in vitro".

Os valores obtidos (Figura 06) demonstram que o *Bacillus subtilis* permaneceu viável e estável no produto acabado (Biotop®). GONÇALVES et al., (2007), comprovaram a viabilidade de um probiótico termo-resistente, encapsulado e liofilizado, composto por *B. cereus* (ATCC 9634) e *B. subtilis* (CCT 3131), através da sobrevivência das bactérias qualitativamente e quantitativamente. Esta viabilidade reside basicamente na sua capacidade de esporular, o que lhes confere sobrevivência durante a elaboração, transporte e armazenamento dos produtos (GIL TURNES et al.,1999).

De maneira geral, após o *B. subtilis* ter sido isolado, pôde-se (Figura 06) observar através da enumeração, uma taxa de crescimento, em função do tempo, bastante expressiva, sendo observado 8,95; 9,26 e 9,32 Log UFC/mL após 2, 4 e 6 horas de incubação (Figura 06), respectivamente. Estes resultados "in vitro", demonstram a provável capacidade deste microrganismo em multiplicar-se em taxa mais rápida do que a de passagem gastrintestinal de aproximadamente 2% a 5% por

hora, quando utilizado “in vivo”, corroborando com as afirmações de DJOUVINOV & TODOROV (1994).

No entanto, deve-se verificar que alguns microrganismos patogênicos, principalmente estirpes selvagens mais resistentes, possuem uma taxa de crescimento bastante semelhante a do *B. subtilis*, o que possivelmente interfere na sua atividade probiótica. Este fato pode ser demonstrado na Figura 06, observando-se a semelhança entre a curva de crescimento da *E. coli* patogênica (cepa selvagem) e a curva de crescimento do *B. subtilis*, quando comparados à da *E. coli* (ATCC 25922) que apresentou taxa de crescimento menos expressiva com o decorrer do tempo de incubação. De forma análoga, para as estipes de *C. perfringens* e *Salmonella* ssp., também foram encontrados valores de crescimento menos expressivos no decorrer do tempo. Este fato pode, provavelmente, ser explicado devido ao fato das estirpes apresentarem menor resistência, além de serem mais exigentes quanto às condições de cultivo.

Quanto à detecção da atividade antimicrobiana do *B. subtilis*, no teste de inibição, os resultados demonstraram ausência de formação de halos de inibição para os microrganismos Gram-negativos testados (*E. coli* ATCC, *E. coli* e *Salmonella)*. No entanto, é importante ressaltar que no teste de inibição contra microrganismos Gram-positivos (*C. perfringens*) observou-se presença de halos de inibição. Este fato pode ser explicado em decorrência da provável produção de uma bacteriocina pelo *B. subtilis*.

Esta observação corrobora com as informações técnicas implícitas nos critérios clássicos estabelecidos por TAGG et al. (1976), que relatam o espectro de atividade antimicrobiana das bacteriocinas normalmente é restrito às espécies homólogas, porém algumas apresentam um amplo espectro de atividade, inibindo não somente as espécies homólogas como, também, outros gêneros de microrganismos Gram-negativos.

Segundo KLAENHAMMER (1993) o modo de ação, o espectro de atividade e a especificidade das bacteriocinas são variáveis. O espectro de ação da Subtilina, bacteriocina produzida pelo *B. subtilis*, não está totalmente elucidada (MONTIVILLE et. al.,2001).

No teste subseqüente, de caracterização do efeito inibitório, não foram observadas formações de halos de inibição em nenhum dos ensaios realizados. Neste caso, não se pode afirmar que o *B. subtilis* não seja capaz de produzir substâncias antimicrobianas, pois no teste de inibição, o mesmo foi capaz de inibir o *C. perfringens*. Pode-se inferir, desta forma, que a metodologia adaptada de PILET et al. (1995) não favoreceu a produção de substâncias antimicrobianas pelo *B. subtilis.*

Os resultados da determinação do efeito do EDTA sobre a multiplicação de *E. coli, E. coli* (ATCC 25922)*, Salmonella* spp. e *C. perfringens* em combinação de *B. subtilis* ou Nisina no decorrer do tempo, estão dispostos na Tabela 02.

Em relação ao *C. perfringens,* observa-se (Tabela 2) que no tratamento 1, a presença do permeabilizante de membrana externa de patógenos (EDTA) foi efetivo na diminuição da população de *C. perfringens* a partir da segunda hora de incubação, sendo mais eficiente com o decorrer do tempo.

No tratamento 2, observa-se que a associação do EDTA com a Nisina foi bastante eficaz em inibir o desenvolvimento do microrganismo em questão desde o início do processo de incubação. As avaliações do presente experimento tiveram como referência os parâmetros do estudo desenvolvido por STEVENS et al., (1991), que implicam no uso do EDTA como um agente facilitador da ação bacteriocina, em combinação ou não com outros antimicrobianos.

Tabela 2. Determinação do efeito do EDTA sobre a multiplicação microbiana em combinação com *B. subtilis* ou Nisina no decorrer do tempo.

Tratamentos	***Microrganismos Avaliados***	***Tempos / (UFC/mL)***		
		2 horas	***4 horas***	***6 horas***
		C. perfringens [1]		
T1	*C. perfringens*	290	180	167
T2	*C. perfringens*	0	0	0
T3	*C. perfringens*	44	38	36
	Bacillus subtilis	100	78	72
		E.coli [2]		
T1	*E. coli*	>300	>300	>300
T2	*E. coli*	>300	30	6
T3	*E. coli*	>300	>300	180
	Bacillus subtilis	>300	>300	>300
		***E.coli* (ATCC)** [3]		
T1	*E. coli*	>300	>300	280
T2	*E. coli*	52	5	1
T3	*E. coli*	>300	140	36
	Bacillus subtilis	>300	>300	>300
		Salmonella [4]		
T1	*Salmonella* spp.	>300	270	220
T2	*Salmonella* spp.	100	53	30
T3	*Salmonella* spp.	200	156	170
	Bacillus subtilis	>300	>300	>300

[1]Tratamento 1: EDTA + *Clostridium perfringens* isoladamente; Tratamento 2: EDTA + *C. perfringens* + Nisina; Tratamento 3: EDTA + *C. perfringens* + *B. subtilis.*

[2] Tratamento 1: EDTA + *E. coli* isoladamente; Tratamento 2: EDTA + *E. coli* + Nisina; Tratamento 3: EDTA + *E. coli* + *B. subtilis.*

[3] Tratamento 1: EDTA + *E. coli* isoladamente; tratamento 2: EDTA + *E. coli* e Nisina; Tratamento 3: EDTA + *E. coli* + *B. subtilis.*

[4] Tratamento 1: EDTA + *Salmonella* spp. isoladamente; Tratamento 2: EDTA + *Salmonella* spp. + Nisina; Tratamento 3: EDTA + *Salmonella* spp. + *B. subtilis.*

De acordo com os resultados apresentados no tratamento 3, verifica-se que a associação do EDTA com *B.subtilis* apresentou-se capaz de afetar a capacidade de multiplicação do *C. perfringens*. Vale ressaltar que a multiplicação do *B. subtilis* foi alterada em menor escala sob as mesmas condições. Diante disso, pode-se inferir que o *B. subtilis*, na presença do EDTA, foi capaz de inibir a multiplicação do *C. perfringens* nas primeiras 2 horas de incubação, em virtude da eficiência de multiplicação do *B. subtilis* em relação ao *C. perfringens*. Além disso, especula-se uma possível produção de bacteriocina pelo *B. subtilis,* concordando com os resultados apresentados no teste de inibição de crescimento contra *C. perfringens*.

Na Tabela 2, observam-se também os dados referentes à capacidade de multiplicação da *E. coli* em diferentes tratamentos e no decorrer do tempo de incubação. De acordo com os resultados encontrados, pode-se verificar que no tratamento 1, o EDTA não foi efetivo contra a capacidade de multiplicação da *E. coli.* No entanto, quando o EDTA foi associado à Nisina (Tratamento 2), a diminuição da população de *E. coli* foi significativa. No Tratamento 3, observa-se que o *B. subtilis* auxiliou a inibição de *E .coli* após seis horas após a incubação. Tal fato pode ser explicado em decorrência do efeito de inibição por exclusão competitiva promovido pelo *B. subtilis,* uma vez que o mesmo não apresentou diminuição da população ao longo do tempo.

No que se refere às cepas de *E. coli* (ATCC 25922) e *Salmonella*, observa-se (Tabela 2) que no tratamento 1, de ambos os microrganismos, o EDTA foi menos efetivo em diminuir a população de *E. coli* (ATCC) e de *Salmonella* quando comparado com o *C. perfringens* . No tratamento 2, a associação da Nisina com EDTA permitiu a inibição da multiplicação dos microrganismos em questão. STEVENS et al., (1991) observaram que o uso de Nisina na concentração de 50 µg/mL em combinação com EDTA (20 mM) foi capaz de reduzir em 3 a 6 ciclos logarítmicos as populações de diferentes sorotipos de *Salmonella*. Para o tratamento 3, pode-se observar que houve redução significativa na população de *E. coli* e *Salmonella*, em virtude da ação do EDTA na presença do *B. subtilis*.

Desta forma, fica evidente a capacidade antimicrobiana do isolado de *B. subtilis* contra os microrganismos testados, principalmente contra a estirpe de *C. perfringens*. Tal fato pode ser evidenciado comparando-se os tratamentos 1 e 3 para os microrganismos testados, ou seja, a adição de *B. subtilis* reduziu significativamente as populações de microrganismos.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados do teste de sensibilidade à antimicrobianos pelo método de difusão em discos. Os antibióticos testados foram baseados na antibióticoterapia de animais convalescentes por infecções bacterianas.

Através da análise da Tabela 3, especula-se que o probiótico composto por *B. subtilis* pode ser utilizado durante ou após a antibióticoterapia, uma vez que este

microrganismo apresentou-se resistente a todos os antibióticos testados. Ressalta-se que os resultados dos testes para *B. subtilis* foram uma adaptação à interpretação das normas, visto que as mesmas ainda não apresentam resultados suficientes.

Tabela 3. Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos.

Bactérias	**TET (30 µcg)**	**EST (10 µcg)**	**TRI (5 µcg)**	**SUT (25 µcg)**	**NOR (10 µcg)**	**DOX (30 µcg)**
Bacillus subtilis	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
E. coli (ATCC 25922)	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
Salmonella	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
C. perfringens	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível

TET – Tetraciclina; EST – Estreptomicina; TRI – Trimetoprima; SUT – Cotrimoxazol; NOR – Norfloxacina; DOX – Doxiciclina.

Para a utilização dos antibióticos testados contra os microrganismos *E. coli*, *E. coli* (ATCC), *Salmonella* e *C. perfringens*, os resultados demonstram sensibilidade a todos os princípios ativos avaliados, com exceção somente do *C. perfringens* que apresentou resistência ao antibiótico Trimetoprima.

HOA et al. (2000) descrevem que a utilização de probióticos durante ou após uso prolongado de antibióticos restabelece a flora bacteriana normal. Diante do exposto e corroborando com a afirmação do autor supracitado, fica comprovada a eficiência dos antibióticos referenciados contra os microrganismos patogênicos, exceto para *C. perfringens,* sem comprometer a terapia com o probiótico composto pelo *B. subtilis* testado.

5.2. Experimento 2

5.2.1. Ganho de Peso e Perímetro Torácico

Os resultados de ganho de peso diário (kg/dia) dos bezerros suplementados ou não com probiótico encontram-se dispostos na Figuras 07. Observa-se que o probiótico apresentou efeito significativo sobre o ganho de peso diário (kg/dia) dos bezerros,

somente a partir do vigésimo oitavo dia de avaliação, sendo que o tratamento T4 apresentou maior (P<0,05) valor para esta variável, seguido pelos tratamentos T3 e T2. O tratamento T1 (controle) apresentou o menor valor de ganho de peso diário entre os tratamentos testados. Ë importante ressaltar que os tratamentos T3 e T2 não apresentaram diferenças significativas (P>0,05) para o ganho de peso diário neste período.

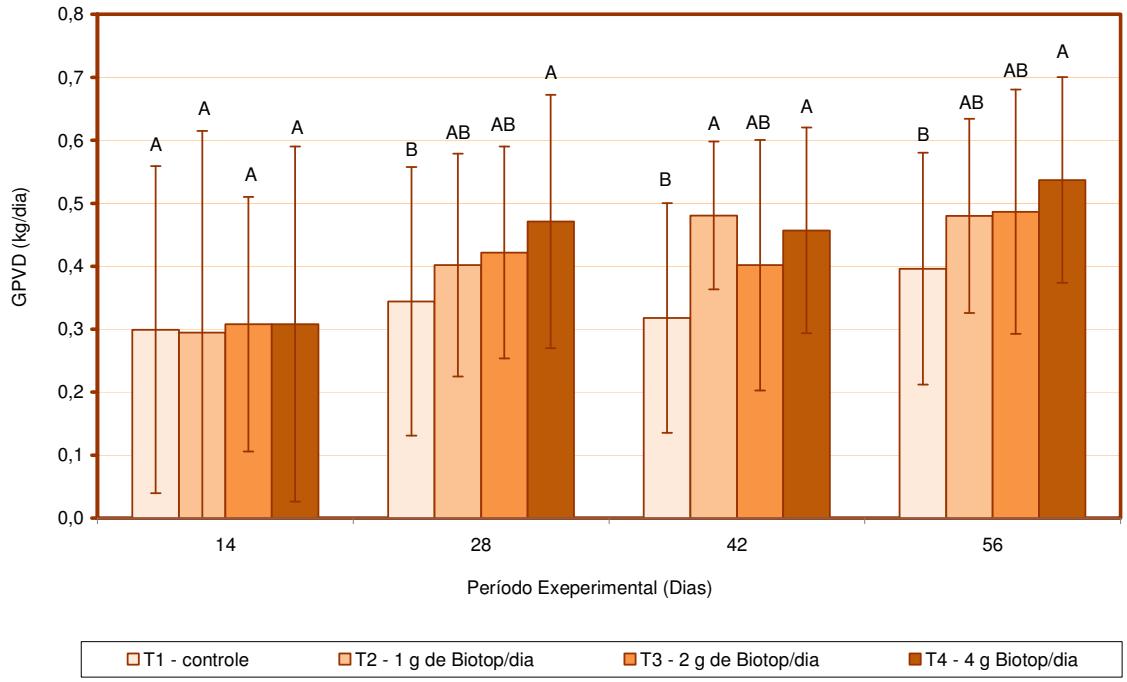

Figura 07. Ganho de peso diário (kg/dia), desvio padrão (kg) e resultados das comparações múltiplas dos grupos experimentais de bezerros da raça Holandesa.

Na análise da Figura 07, constata-se que aos 42 dias do período de avaliação, os bezerros submetidos aos tratamentos T4 e T2 apresentaram maiores valores de ganho de peso (kg/dia), quando comparado aos tratamentos T3 e T1. Tal fato pode ser explicado em virtude dos animais do tratamento T4 terem apresentado maior incidência de diarréia, fato este que comprometeu sobremaneira o consumo de alimentos (feno e ração concentrada) e, conseqüentemente, o desempenho ponderal dos mesmos. Da

mesma forma que aos 28 dias de avaliação, os tratamentos T3 e T2 não apresentaram diferenças significativas (P>0,05) para o ganho de peso diário.

Decorrido o período de 56 dias do inicio das avaliações, observou-se (Figura 07) que os animais do tratamento T4 apresentaram o maior (P<0,05) ganho de peso diário, quando comparado com os demais tratamentos. Já os tratamentos T2 e T3 apresentaram ganho de peso diário semelhante, diferindo somente do tratamento T1, que apresentou o menor ganho de peso no período avaliado.

De maneira geral, pode-se inferir que os animais dos tratamentos T2, T3 e T4 poderiam ter apresentado maiores valores de ganho de peso, quando comparado com os animais do tratamento T1, uma vez que o probiótico propiciou maior consumo de matéria seca de feno, proporcionalmente ao consumo de matéria seca de concentrado. No entanto, através na análise da Tabela 1 pode-se observar que o feno de Tifton 85 utilizado no presente experimento apresentou teores elevado de fibra em detergente neutro (FDN) e baixos teores de proteína bruta (PB), condição esta que limitou sobremaneira seu consumo e, consequentemente o desempenho dos animais, mesmo recebendo inclusão do probiótico na dieta.

Trabalhando com vitelos, TIMMERMAN et al. (2005) compararam um probiótico comercial para humanos e outro obtido de isolados de fezes de bezerros. Os autores concluíram que o probiótico fornecido a bezerros com uma semana de idade aumentou o ganho de peso nas duas primeiras semanas de vida, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

MEYER et al. (2001) trabalharam com 79 bezerros da raça Holandesa que receberam dieta líquida, composta por leite integral a partir do 3º dia de vida, ou sucedâneo do leite a partir do 3º ou sucedâneo a partir do 15º dia de vida, com ou sem adição do probiótico, composto por *Lactobacillus acidophilus, Enterococus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* e também verificaram que o probiótico foi efetivo em promover maior ganho de peso nos animais que receberam sucedâneo do leite a partir do 3º dia de vida em comparação com o tratamento sem adição da cultura probiótica.

ARENAS et al. (2007) trabalharam com 108 bezerros da raça Nelore em regime de pastagens e verificaram que a adição de probiótico, composto por Amilase, celulase,

protease, lípase, pectinase, *Lactobacillus acidophilus, Estreptococus faecium, Bifidobacterium thermophilum e Bifidobaterium longum,* promoveram 33,28% a mais de ganho de peso quando comparado com o grupo controle, comprovando a eficiência do probiótico em promover ganho de peso.

Em contrapartida, CHAVES et al. (1999) observaram que o ganho de peso diário de bezerros submetidos ao tratamento com ou sem adição de probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) durante 56 dias, foi inferior (554 g/dia) nos animais que receberam o probiótico em comparação aos que não receberam o aditivo (570 g/dia). Demonstrando, desta forma, a necessidade de avaliação das diferentes cepas utilizadas como probiótico.

No que se refere aos resultados de perímetro torácico (cm) dos bezerros, estes estão dispostos na Figura 08.

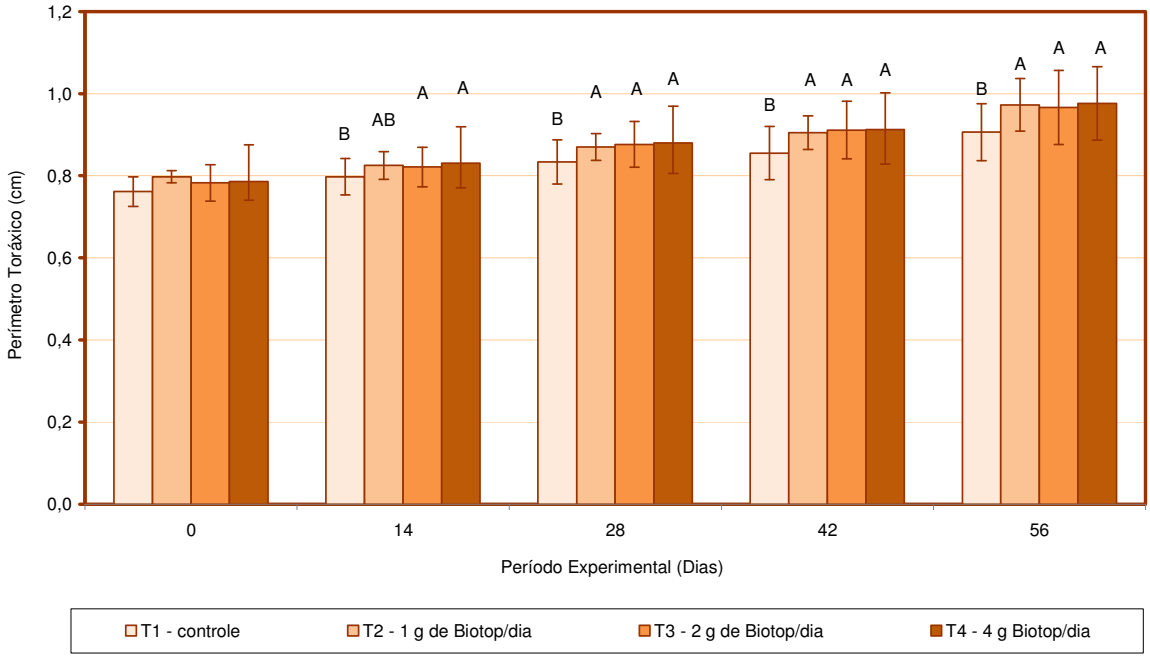

Figura 08. Perímetro torácico (cm), Desvio Padrão (kg) e resultados das comparações múltiplas de bezerros da raça Holandesa.

A análise da Figura 08 demonstra que os bezerros suplementados com probiótico (tratamentos T2, T3 e T4) apresentaram maior ($P<0,05$) perímetro torácico (cm) no decorrer do período de avaliação, quando comparado com os animais do

tratamento controle (T1). No entanto, é importante ressaltar que não se observaram diferenças estatísticas (P>0,05) para esta variável entre os animais dos tratamentos T2, T3 e T4 a partir do 28º dia até o 56º dia. No 28º dia de avaliação, pôde-se observar que os animais do tratamento T2 apresentaram perímetro torácico (cm) semelhante ao tratamento T1.

Em trabalho conduzido por LESMEISTER et al. (2004), a ação do probiótico em bezerros a partir de dois dias de idade, adicionado de 1% ou 2% da cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus*) na ração concentrada, aumentou significativamente o consumo de matéria seca, no ganho de peso, na altura da cernelha e da garupa dos bezerros, especialmente com a inclusão de 2% da cultura.

Os dados encontrados no presente trabalho corroboram com aqueles encontrados por BEERMAN (1995), que avaliou 52 bezerros holandeses apresentando um histórico de prevalência de diarréia e encontrou efeito positivo do probiótico sobre o ganho de peso (kg/dia) e altura de cernelha (cm) quando comparado com animais que não receberam probiótico.

5.2.2. Consumo de Matéria Seca e Conversão Alimentar

Os resultados referentes ao consumo de matéria seca do feno (kg/dia), da ração concentrada (kg/dia), bem como de matéria seca total (kg/dia) estão dispostos nas Figuras 09, 10 e 11.

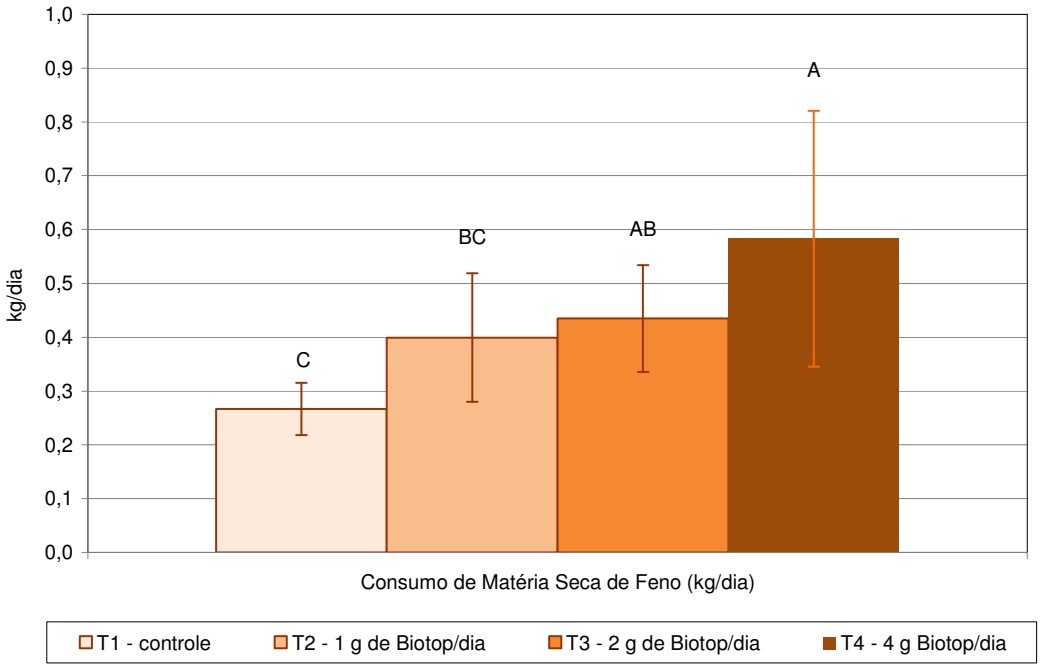

Figura 09. Resultados das comparações múltiplas do consumo de matéria seca de feno (kg/dia) dos bezerros da raça Holandesa no período de 56 dias.

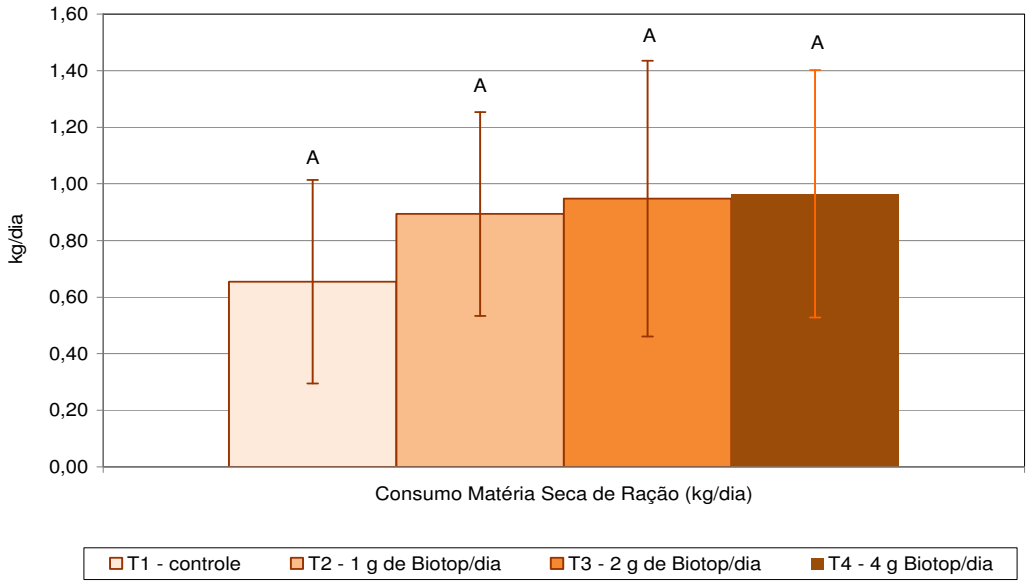

Figura 10. Resultados das comparações múltiplas do consumo de matéria seca de ração (kg/dia) dos bezerros da raça Holandesa no período de 56 dias.

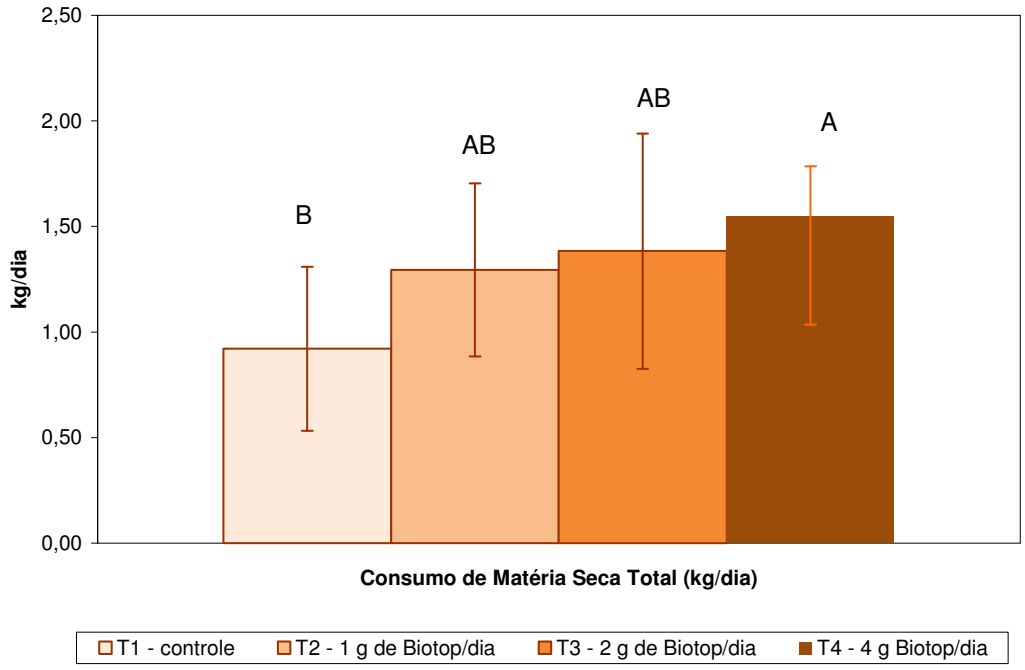

Figura 11. Resultados das comparações múltiplas do consumo de matéria seca total (kg/dia) dos bezerros da raça Holandesa no período de 56 dias.

A análise da Figura 09, referente ao consumo de matéria seca de feno (kg/dia), demonstra que o consumo dos animais suplementados com probiótico foi maior ($P<0,05$) que dos animais do tratamento controle (T1). Dentre os tratamentos com probiótico, o tratamento T4 apresentou o maior ($P<0,05$) consumo de matéria seca de feno, quando comparado com os tratamentos T2 e T3. Já o tratamento T3 apresentou resultados semelhantes ao tratamento T2, da mesma forma que o tratamento T2 em relação ao tratamento T1.

Em relação ao consumo de matéria seca de ração concentrada (kg/dia), a Figura 10 demonstra não haver diferenças significativas ($P>0,05$) para esta variável entre os animais que foram suplementados com probiótico daqueles que não foram. Este fato pode ser explicado em virtude do encerramento abrupto do fornecimento do sucedâneo aos bezerros, independentemente do tratamento, condição esta que implicou em aumento do consumo de ração concentrada, em virtude do melhor valor nutritivo apresentado (Tabela 1) pela mesma, em comparação ao feno de Tifton 85.

GORGULU et al. (2003) avaliaram o efeito do probiótico sobre o consumo de matéria seca de concentrado e, constataram, que os animais tratados com probiótico apresentaram consumo médio diário de 780 g/dia contra 669 g/dia do grupo controle. De acordo com os autores supracitados, o consumo de forragem e de concentrado pode sofrer variações expressivas entre os animais tratados ou não com probióticos, em virtude da variação do estado sanitário dos animais e também devido à adaptação dos mesmos à alimentação.

Na Figura 11 pôde-se observar o consumo de matéria seca total (kg/dia) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. De maneira geral, constatou-se que os animais do tratamento T4 apresentaram o maior ($P<0,05$) consumo de matéria seca quando comparado aos demais tratamentos. Em relação aos animais dos tratamentos T3 e T2, estes não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre si, embora o tratamento T3 tenha apresentado consumo de matéria seca um pouco superior ao tratamento T2.

Comparando com os resultados obtidos por CHAVES et al. (1999), o *Bacillus subtilis* (Biotop®) foi mais eficiente em estimular o consumo de matéria seca em relação ao *Lactobacillus acidophilus,* que não apresentou diferenças significativas no consumo de matéria seca de bezerros holandeses suplementados ou não com probióticos.

De acordo com ÁVILA et al. (2007), a utilização de probiótico administrado juntamente com alimentos para bezerros, estimula o desenvolvimento precoce do rúmen devido à produção, principalmente de ácidos graxos voláteis, antecipando a ingestão de matéria fibrosa como capim ou feno. De acordo com estes autores, o fornecimento de probiótico estimula o desenvolvimento de bactérias celulolíticas no rúmen e, conseqüentemente, promove incremento nos níveis de consumo de matéria seca.

Segundo SIUTA (1997), os principais benefícios no fornecimento de substâncias probióticas para bezerros lactentes referem-se à supressão no desenvolvimento de bactérias patogênicas no intestino delgado e também por promover maior absorção de nutrientes neste órgão.

Na Figura 12 observa-se os resultados de conversão alimentar dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Pode-se constatar que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas (P>0,05) entre si. No entanto, vale ressaltar que os animais pertencentes ao tratamento T4 apresentaram conversão alimentar superior aos demais tratamentos, provavelmente em virtude do estimulo ao consumo de feno provocado pelo probiótico.

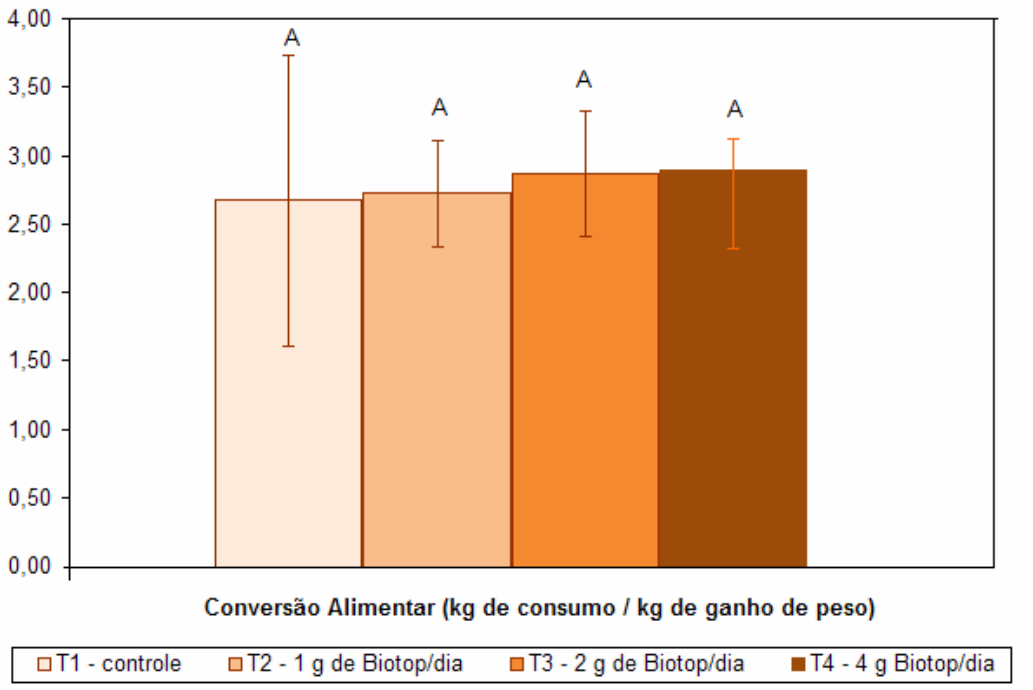

Figura 12. Resultados das comparações múltiplas da conversão alimentar (kg de consumo / kg de ganho de peso) de bezerros da raça Holandesa no período de 56 dias.

Alguns autores como MEYER et al. (2001), verificaram que o probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus, Enterococus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* foi efetivo em promover aumento na conversão alimentar de bezerros. Os autores avaliaram 79 bezerros da raça Holandesa recebendo dieta líquida, composta por leite integral ou sucedâneo do leite a partir do 3º dia de vida, ou sucedâneo a partir do 15º dia de vida, com ou sem adição do probiótico.

5.2.3. Desafio bacteriano e Presença de *Bacillus* spp e *E. coli* nas Fezes

Nas Figura 13 e 14 estão dispostos os resultados referentes à presença de *Bacillus* spp. e *E.coli* nas fezes dos bezerros antes e após 72 horas da infecção com *E.coli* patogênica.

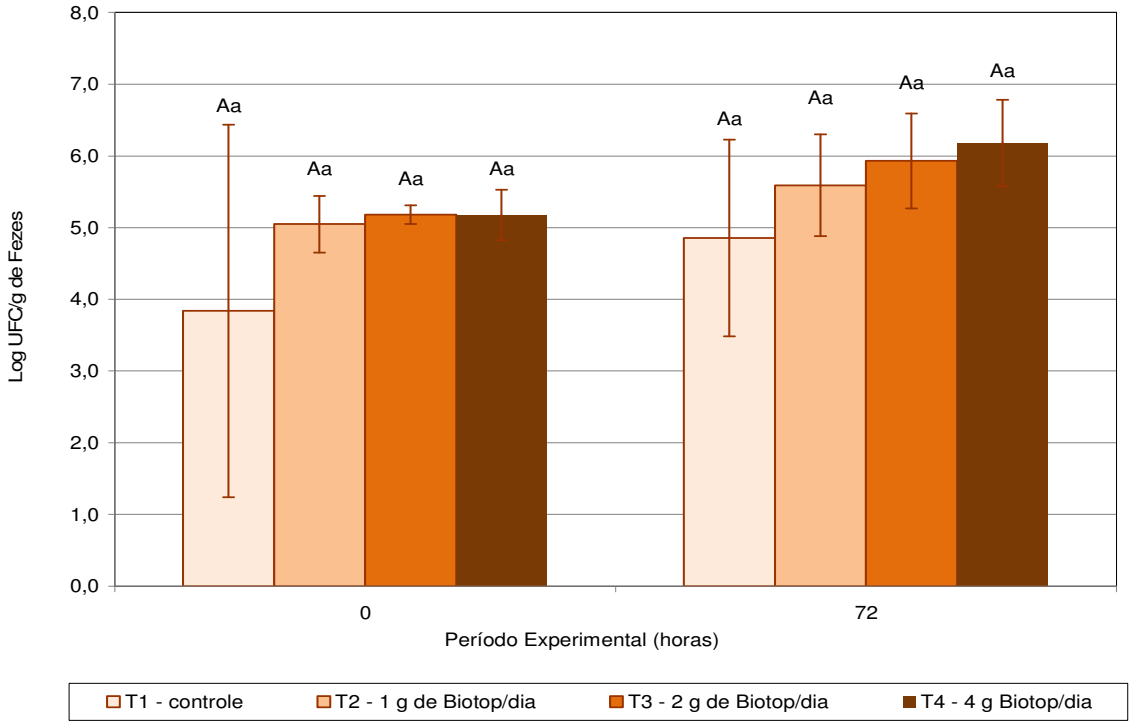

Figura 13. Resultados das comparações múltiplas das médias de Log UFC *Bacillus* spp. / g de fezes dos grupos experimentais.

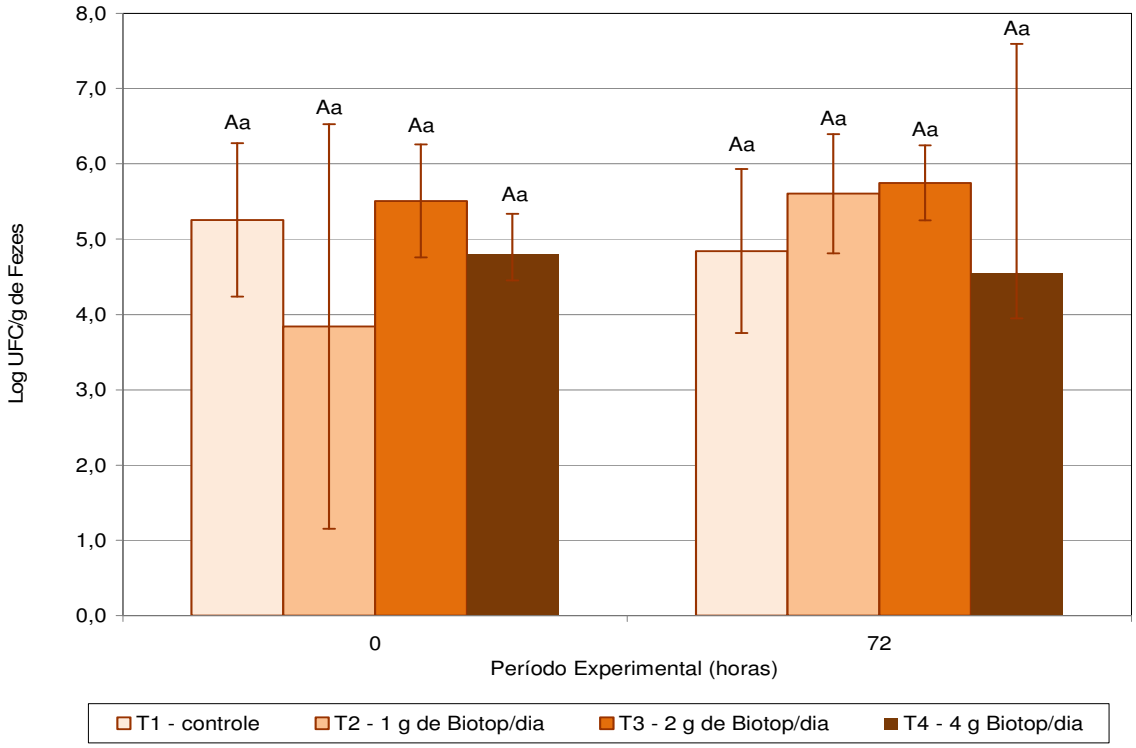

Figura 14. Resultados das comparações múltiplas das médias de Log UFC *E. coli* / g de fezes dos grupos experimentais.

Na Figura 13, pode-se observar que os diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (P<0,05) para a presença de *Bacillus* spp., tanto no período anterior como após 72 horas da infecção bacteriana. Além disso, a comparação dos tratamentos, nos diferentes períodos, também não demonstraram diferenças significativas em relação à prevalência de *Bacillus* spp. nas fezes, embora seja perceptível identificar que os tratamentos com inclusão do probiótico tenham apresentado maiores valores de Log UFC/g de fezes, quando comparado com o tratamento controle (T1).

Em relação à população de *E. coli*, na Figura 14 observa-se que não foram constatadas diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos, quanto à prevalência deste microrganismo, tanto no período anterior à infecção como após 72 horas da mesma. Além disso, a comparação dos tratamentos nos períodos também não

demonstrou diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos avaliados, embora o tratamento T4 tenha apresentado o menor valor após 72 horas da infecção bacteriana.

TIMMERMAN et al. (2005), comprovaram que um probiótico obtido de isolados de fezes de bezerros foi capaz de reduzir a ocorrência de diarréias e a contagem de coliformes nas fezes.

5.2.4. Escore de Fezes e Parâmetros Sanguíneos

A análise da aparência física, odor e consistência das fezes dos bezerros antes e após 72 horas da infecção bacteriana com *E.coli* patogênica não demonstrou diferença significativa (P<0,05), entre os parâmetros testados e entre os tratamentos avaliados.

Em relação às análises sanguíneas e à temperatura retal (^{o}C) antes e após 72 horas da infecção bacteriana, não foram observadas diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos e entre os períodos avaliados, para estas variáveis. Tal fato pode ser explicado devido à adequada condição de sanidade dos animais e também devido às condições sanitárias das instalações, que se mantiveram limpas e secas durante todo o período de avaliação.

É importante ressaltar, no entanto, que em virtude dos animais não terem consumido colostro de suas mães, observou-se incidência de diarréia em todos os animais, independentemente do tratamento, sendo tal fato explicado pela baixa imunidade dos animais nas primeiras três semanas de vida.

VI. CONCLUSÕES

A expressiva taxa de crescimento “in vitro” do isolado de *Bacillus subtilis* reforça a provável capacidade deste microrganismo em multiplicar-se em taxa mais rápida do que a de passagem gastrintestinal. Além disso, o *Bacillus subtilis* permanece estável e viável no produto acabado (Biotop®).

O teste de capacidade inibitória do *B. subtilis* demonstrou maior eficácia do isolado contra bactérias Gram-positivas, como *Clostridium perfringens* e menor contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella.*

O probiótico composto por *Bacillus subtilis* é capaz de inibir a multiplicação dos microrganismos patogênicos avaliados, principalmente quando associado a um determinado agente antimicrobiano, como o EDTA.

O probiótico apresentou resistência à atividade antimicrobiana dos antibióticos testados, permitindo, desta forma, sua utilização em situações de antibióticoterapia.

A adição do probiótico na dieta de bezerros da raça Holandesa promoveu aumento do consumo de matéria seca, do ganho de peso e do perímetro torácico, sendo recomendado, portanto, como aditivo promotor do crescimento animal, principalmente na dosagem de 4 g/animal/dia.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENAS, S.E.; REIS, L.S.L.S.; FAZATTI-GALLINA, S.H.; et al. Probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine. In: XVI INTERNATIONAL CONFERENCE ON RABIES IN THE AMERICAS, 2005, Ottawa. **Anais…** Ottawa: Canadian Food Inspection Agency, 2005, p. 99.

ARENAS, S.E.; REIS, L.S.L.S.; FAZATTI-GALLINA, S.H.; et al. Efeito do probiótico Proenzime® no ganho de peso em bovinos. **Archivos Brasileiro de Zootecnia**, v.56, n.213, p.75-78, 2007.

ÁVILA, F.A. **Probiótico: Alternativa Natural.** Agronline.com.br. Disponível em: http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=233. Acesso em: 03 de dezembro de 2007.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.93-496, 1966.

BEEMAN, K. The effect of *Lactobacillus* spp on convalescing calves. **Agri-Practice**, v.6, p.8-10, 1995.

BELIAVSKAIA, V.A. Adjuvant properties of subalin, a recombinant interferon-producing probiotic. **Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii**, v.78, n.6, p.77-82, 2001.

BUTOLO, J. E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, Piracicaba, 1990. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1990, p.85-98.

CALLAWAY, T.R.; CARNEIRO DE MELLO, A.M. S.;RUSSEL, J.B. The effect of Nisin and Monensin on ruminal fermentations in vitro. **Current Microbiology**, v.35, p.90-6, 1997.

CEPELJNIK, T.; ZOREC, M.; KOSTANJSEK, R.; et al. Is *Pseudobutyrivibrio xylanivorans* strain Mz5T suitable as a probiotic? An *in vitro* study. **Folia Microbiology (Praha)**, v.48, p.339-45, 2003.

CHAVES, H. A.; SILVA, J. F. C.; CAMPOS, O. F.; et al. Efeito da estirpe LT 516 de *Lactobacillus acidophilus* como probiótico para bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p.1075-1085, 1999.

CONCEIÇÃO, F. R.; ZANI, J. L.; GIL-TURNES, C. Effect of probiotic CenBiot on the humoral response to an *Escherichia coli* bacterin. **Food and Agricultural Immunology**, v. 14, n. 12, p. 135-140, 2002.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e a resposta immune. **Ciência Rural**, v.34, p.1297-303, 2004.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v.16, 2004.

CROSS, M. L. Microbes vs. Microbes: imune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, n.4, p.545-53, 2002.

CRUYWAGEN, C. W.; JORDAAN, INA; VENTER, L. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance calves. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.483-486, 1996.

DIMICK, K. P.; ALDERTON, G.; LEWIS, J. C.; et al. Purification and properties of subtilin. **Archive Biochemistry**, v.51, p.1-11, 1947.

DJOUVINOV, D. S.; TODOROV, N. A. Influence of dry matter intake and passage rate on microbial protein synthesis in the rumen of sheep and its estimation by cannulation and a non-invasive method. **Animal Feed Science Technology**, v.48, p.289-304, 1994.

EWASCHUK, J. B.; NAYLOR, J. M.; CHIRINO-TREJO, M.; et al. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 249-53, 2004.

FERNANDES, P. C. C.; LADEIRA, I. Q.; FERREIRA, C. L. L. F.; et al. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Caderno Tecnológico de Veterinária e Zootecnia**, v.31, p.53-71, 2000.

FOX, S. M. Probiotics: intestinal inoculants for production animals. **Veterinary Medicine**, Kansas**,** v.83, n.8, p.806-830, 1988.

FULLER, R. Probiotic in man and animals – a review. **Journal Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics**: The Scientific Basis. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1992, 398 p.

GILL-TURNES, C.; et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n.1, p.11-14, 1999.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia Alimentar**, Portugal, p.12-22, 2005.

GONÇALVES, M.; MALUTA, R. P.; DAHLKE, F.; et al. Avaliação da capacidade imunoestimulante e da estabilidade de um probiótico empregado para cães. **Archives of Veterinary Science**, v.12, n.2, p.25-30, 2007.

GORGULU, M.; SIUTA, A.; ONGEL, E.; et al. Effect of probiotic on growing performance and health of calves. **Pakistan Journal of Biological Science**, v.6, n.7, p.651-654, 2003.

GRAMINHA, C. V.; MARTINS, A. L. M.; FAIÃO, C. A.; et al. Viabilidade de alguns aditivos utilizados no confinamento no Brasil. In: CONFINAMENTO: GESTÃO TÉCNICA E ECONÔMICA, I, 2007, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 2007, v.1, p.103-132.

HANCOCK, R.E.W. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. **Journal Medical Microbiology**, v.6, p.1-3, 1997.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. T.; HUIS INT'VELD, J. H. J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics: The Scientific Basis**. London: Chapman e Hall, 1992, p.209-224.

HELANDER, I.M.; WRIGHT, A.V.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. **Trends Food Science Technology**, v.8, p.146-150, 1997.

HELANDER, I. M; MATTILA-SANDHOLM, T. Fluometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.213-219, 2000a.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; et al. Characterization of *Bacillus* species used of oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p. 5241-5247, 2000.

ITODO, A. E; AGBA, M. I.; OKEWOLE, P. A. *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v.31, p.193-195, 1983.

JALC, D.; KISIDAYOVA, S.; NERUD, F. Effect of plant oils and organic acids on rumen fermentation *in vitro*. **Folia Microbiology (Praha)**, v.47, p.171-7, 2002.

JENSEN, J. F.; JENSEN, M. M. The effect of using growth promoting Bacillus strains in poultry. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 13, 1992, Amsterdam. **Proceeding…** Amsterdam: WPSA , 1992, v.3, p.398-402.

JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.5, p.619-624, 2000.

JONES, C. D.; THOMAS, C. N. The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria. In: LYONS, T.P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry: proceedings of Allthec's thirth annual symposium**. Nicholasvile: Allthec Techinical, 1987, p.157-166.

KEAST, J. C., McBARRON, E. J. A cause of bovine enterotoxemia. **Australian Veterinary Journal**, v.30, p.305-306, 1954.

KLAENHAMMER, T. R. Microbiological Considerations in Selection and Preparation of *Lactobacillus* Strains for Use as Dietary Adjuncts. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.7, p.1339-1349, 1982.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v.12, p.39-86, 1993.

KUNTZ, T. B.; KUNTZ, S. T. Enterohemorrhagic *E. coli* Infection. **Fourth Prize Paper**, v.6, p.192-196, 1999.

LARSON, L. L., QWEN, F. G., ALBRIGHT, J. L.; et al. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.989-991, 1997.

LEE, S. S.; HSU, J. T.; MANTOVANI, H. C.; RUSSEL, J. B. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro.* **FEMS Microbiology Letters**, v.217, p.51-5, 2002.

LESMEISTER, K. E.; HEINRICHS, A. J.; GABLER, M. T. Effects of feeding yeast culture and propionibacteria on milk yield and milk components on Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1832-39, 2004.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics grow promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

MAIA, O. B.; DUARTE, R.; SILVA, A. M. Evaluations of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. Enterica ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.183-189, 2001.

MANTOVANI, H.C. Perspectivas da utilização de antibióticos na produção de bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, v.8, 2006, Piracicaba. **Anais…** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luis de Queiroz, 2006, p. 249-276.

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

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studing bacteriocins. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (Ed.). **Methods in Microbiology**, v.7A, New York: Academic Press, 1972, p.315-422.

MAZZA P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, n.133, p.3–18, 1994.

McGILLIARD, M. L.; STALLINGS, C. C. Increase in milk yield of commercial dairy herds fed a microbial and enzyme supplement. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1353-7, 1997.

MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE DE ZOOTECNIA, 38º, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. CD ROOM.

MEYER, P. M.; PIRES, A. V.; BAGALDO, A. R.; SIMAS, J. M. C.; et al. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. **Science Agricultural**, v.58, n. 2, p.215-221, 2001.

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

MONTIVILLE, T. J. et al. Biologically based preservation systems. In: DOYLE, M.P., BECHAT., MONTVILLE, T.J., eds. Food Microbiology: fundamentals and frontiers. 2ed. Washington: **ASM Press**, p.629-648, 2001.

MOTA, R. M., MOREIRA, J. L. S.; SOUZA, M. R.; et al. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v.6. p.1-11, 2006.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suíte 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NIKAIDO, H. Outer membrane. In: NEIDHARDT, F.C.;CURTIS, R., eds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2.ed. Washington: **ASM Press**, 1996. p. 29-47.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; et al. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**, v.2, 2 ed., São Paulo: Makron Books, 1996, p. 22-40.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A. P. R. Mechanisms envolved in the immunodulation by latic acid bacteria. In: FULLER, R. & PERDIGÓN, A. P. R. **Probiotics 3: Immunodulation by the gut microflora and probiotics**, Dordrecht: Klewer Academic, 2000, p. 213-33.

PILET, M. F. et al. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and Carnobacterium divergens isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.58, p.256-262, 1995.

PILET, M. F.; DOUSSET, X.; BARRÉ, R.; et al. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and Carnobacterium divergens isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes***. Journal of Food Protection**, v.58, p.256-262, 1995.

REUTER, G. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. **Bifidobacteria Microflora**, v.9, p.107-118, 1990.

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

SANTOS, J.R.G.; TURNES, C.G. Probióticos em Avicultura. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.741-747, 2005.

SAXELIN, M.; TYNKKYNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; et al. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.1-8, 2005.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P; ISHI, M. Clostidioses em aves. In: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. **Doenças em aves.** Campinas: Facta, 2000. p.242-243.

SIGURDARSON, S.; THORSTEINSSON, T. Sudden death of icelandic dairy cattle. **Veterinary Record***,* v.127, p.410, 1990.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.

SILVEIRA, D.; SOUZA, A.M.; MESQUITA, A.J.; et al. Enterotoxemia em bovinos: uma enfermidade de importância emergente. **Boletim Técnico e Informativo Rhodia-Mérieux***,* v.2, p.1-4, 1995.

SIUTA, A.The role of probiotics in the organism. **Acta Agraria et Silvestria,** v.35, p.33-45, 1997.

STEVENS, K.A.; et al. Nisin treatment for inativation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.12, p. 3613-3615, 1991.

TAGG, J. R.; et al. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, p.722-756, 1976.

TIMMERMAN, H. M.; MULDER, L.; EVERTS, H.; et al. Health and growth of veal calves fed milk replaces with or without probiotics. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.6, p.2154-71, 2005.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Review**, v.56, n.3, p. 395-411, 1992.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne Pathogens. **An Ilustraded text**. London: Mosby Year Book, 1991, p. 577.

VASSALO, M.; FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, A.I.G. Probióticos para leitões dos 10 aos 30 Kg de peso vivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n.1, p. 131-138, 1997.

ZANETTI, M. A. Uso de aditivos em dietas de bezerros holandeses. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Porto Alegre, RS, p. 76-79, 1999.