

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/03/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

RAFAELA ALTARUGIO

Botucatu-SP, setembro de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

RAFAELA ALTARUGIO

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

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

Altarugio, Rafaela.

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

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

Orientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50503014

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

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

Data da Defesa: setembro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

CAPITULO 1

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

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

RESUMO:

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

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

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

ABSTRACT:

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

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

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO E APLICAÇÃO

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço à agência FAPESP auxílio nº 2015/00383-2 pelo apoio financeiro para realização deste projeto.