

Mércia Rodrigues Barros

**Identificação e avaliação *in vitro* da atividade inibitória de
Lactobacillus spp., isolados do ingluvío e cecos de aves
(*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758), em relação a sorotipos de
*Salmonella***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica Veterinária.

Botucatu – SP

2003

Mércia Rodrigues Barros

**Identificação e avaliação *in vitro* da atividade inibitória de
Lactobacillus spp., isolados do ingluvío e cecos de aves
(*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758), em relação a sorotipos de
Salmonella.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Botucatu – SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Barros, Mércia Rodrigues.

Identificação e avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus spp* isolados do ingluvío e cecos de aves (*Gallus gallus*, Linneaus, 1758), em relação a sorotipos de *Salmonella* / Mércia Rodrigues Barros. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Assunto CAPES: 50503014

1. Lactobacilo 2. Salmonela

CDD 616.01

Palavras-chave: Identificação; *Lactobacillus*; PCR; *Salmonella*; Inibição;
Aves

Aos meus HERÓIS, que semelhante à árvore amiga , fincaram os seus pés na terra como se fossem raízes, buscando as inspirações dos céus e alteando a fronte qual copa de vegetal, ofereceram sombra e frutos aos seus nove filhos, e mesmo diante dos obstáculos contornaram as pedras e seguiram em frente, perseverante como as estrelas e radiante como o sol permaneceram brilhando, lutando e nos preparando para a vida, compreendendo em cada um as suas diferenças e respeitando as nossas decisões diante das escolhas que fizemos na vida. Responsáveis maior pelo meu aprimoramento moral, intelectual e espiritual. Muito obrigada pelo vosso amor e por serem meus pais **José Lacerda Barros e Florisa Rodrigues Barros.**

Aos meus irmãos **Heliem, Chermont, Iolanda, Elza, Sírleis, Adalberon, Teilhard e Conceição** que compreenderam a minha ausência e mesmo diante da distância sempre me incentivaram na busca dos meus ideais e ofereceram amor. Aos meus sobrinhos pelo início de vida e alegria, obrigada por fazerem parte da minha vida.

DEDICO.

Saber esperar é arte de sabedoria a nos cortar horizontes renovados de luz à nossa frente. Agindo como mestre transmitiu os seus conhecimentos e respeitou os meus passos, mas sempre segurando em minhas mãos como instrumento de amparo me guiou e ensinou que a perseverança é estrela vitoriosa do sonho a ser conquistado.

Ao Prof. Ass. Dr. **Raphael Lucio Andreatti Filho** pela orientação e amizade.

OFEREÇO.

Na alma que confia, palavras e sorriso nos lábios fizeram surgir em nossas vidas um laço de amizade, indestrutível diante da distância, sincero e leal na presença das dificuldades nos convidando à reflexão e aprendizado. Obrigada pela vossa amizade.

Louisiane de Carvalho Nunes e Andréa Alice da Fonseca Oliveira.

AGRADEÇO.

AGRADECIMENTOS

A ti sou grata, verdadeiro Deus que ilumina minha vida, abrindo os olhos da alma e fazendo com que eu possa enxergar o movimento íntimo das coisas.

Em especial, ao Prof. Dr. Deílson Elgui de Oliveira que abriu as portas do Laboratório de Biologia Molecular possibilitando-me realizar este trabalho, auxiliando com seu conhecimento científico e acima de tudo oferecendo o que há de melhor no ser humano, à vontade de servir.

Aos meus amigos nordestinos, Andréa, Louisiane, Adriana Wanderley, Homero, Cristiane Barreto, Daniel Pessoa, Daniel Viana, Marcos Eielson, Ranielly, Wildo, Edna, Socorro, Rudson, Leomar, Francisco Feliciano, Lílian Kardnalli, Liliane, Fabíola e José Filho, que me proporcionaram momentos de alegria, relembando a minha cultura e o meu povo.

Aos meus amigos do Centro Espírita Amor e Luz por todos os momentos que compartilhamos na busca do aprimoramento espiritual, a distância não existirá entre nós, o que une os seres são os laços espirituais, sempre estarei com vocês.

Ao Prof. Dr. Josias Rodrigues por conduzir os meus passos iniciais no conhecimento da Biologia molecular.

As novas amigas Glenda Nicioli e Suzane Ramos que auxiliaram e compartilharam comigo as tristezas e alegrias durante os momentos de padronização da técnica da PCR.

A Edna Teresa de Lima por auxiliar na execução em parte deste trabalho.

A Dra. Tomoe Noda Saukas importante na minha vida acadêmica pelos seus ensinamentos e amizade conquistada, mesmo distante sempre se fez presente com suas sábias palavras nos momentos em que mais precisei.

Aos docentes Julio Lopes Sequeira, Tereza Cristina Sequeira, Noeme Rocha, Lígia Boretti e Márcio Kuchembuck pela amizade conquistada ao longo destes anos, vocês moram no meu coração.

Aos residentes e pós-graduandos do Laboratório de Ornitopatologia, Aline Mesquita, Sílvia de Almeida, Adriano Sakai, Paulo Gratão e Catharine Gurgel pela colaboração durante a realização deste trabalho.

A Celene, Marquinhos e Carlão funcionários do Departamento de Patologia da Medicina, por me receberem de braços abertos e alegrarem os meus dias.

Aos funcionários Luiz Antônio Matiazzi, Maury Raul, Marcelo Cristófarro e Benedito Placidelli por me estenderem mãos amigas.

Aos amigos Sara, Marlene, Celmira, Camila, Fábio, Fred, Anne, Gaspar, Darlene Barreto e família pelo carinho, convívio e amizade dispensadas a mim.

A Dra. Neusely da Silva (Instituto de Tecnologia de Alimentos) por gentilmente ceder amostra de referência para a padronização da técnica da PCR.

A todos os funcionários da Biblioteca – UNESP- Botucatu que me receberam com sorriso e mãos estendidas sempre que precisei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo incentivo à pesquisa e possibilitar a realização deste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu –SP, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Às Granjas Céu Azul e Ninho Verde pelo fornecimento do material para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Ass. Dr. Adalberto José Crocci, do Departamento de Bioestatística, por me receber sempre com alegria e auxiliar na análise estatística.

RESUMO

A colonização da mucosa intestinal por grande e diversificado número de bactérias é achado normal no homem e nos animais, incluindo as aves. Produtos de exclusão competitiva e/ou probióticos quando administrados às aves, devem promover a redução na colonização de patógenos potencialmente perigosos à saúde avícola e humana, como bactérias do gênero *Salmonella* e conseqüente equilíbrio na microbiota intestinal normal. O presente trabalho teve por objetivos verificar a presença de *Lactobacillus* spp. na microbiota do ingluvío e cecos de aves, identificar as espécies através dos métodos PCR e bioquímico e avaliar a capacidade da atividade inibitória *in vitro* das espécies isoladas frente a oito sorotipos de *Salmonella*. Utilizou-se aves reprodutoras e de postura comercial como doadoras de ingluvío e cecos para o isolamento e identificação de *Lactobacillus*. As amostras isoladas foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* através dos testes de coloração de Gram positiva, catalase negativa, produção de gás em glicose e H₂S em Tríplice Sugar Iron (TSI) negativo. Posteriormente, submetidas ao padrão de fermentação dos carboidratos e a PCR, para identificação das espécies de *Lactobacillus*. O método da PCR apresentou-se mais sensível mostrando resultados diferentes do método bioquímico. No bioquímico identificou-se *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. sp.*, enquanto na PCR, *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. sp.* Todas as espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío e cecos de aves apresentaram amostras que inibiram *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*.

Palavras chaves: Identificação, *Lactobacillus*, PCR, inibição, *Salmonella*, aves.

ABSTRACT

Intestinal mucosa colonization by a diverse and great number of bacteria is considered normal among men and animals including poultry. Competitive exclusion products and \or probiotics when given to poultry should promote pathogen colonization reduction which is potentially danger to human and poultry health like *Salmonella* and consequently a balance on normal intestinal microbiota. The present work aimed at verifying *Lactobacillus spp* on crop microbiota and poultry cecum, identifying species through PCR and biochemical methods and to evaluate *in vitro* inhibitory activity ability from species isolated against eight *Salmonella* serotypes. Production delivery and reproduction poultry were used as crop and cecum donors to isolate and identify *Lactobacillus*. Isolated samples were characterized as belonging to *Lactobacillus* species through coloration gram positive tests, negative catalase, glucose gas production and H₂S in negative triple sugar iron (TSI). Afterwards, samples were subjected to carbohydrate fermentation pattern and to PCR to identify *Lactobacillus* species. PCR method has shown to be more sensitive presenting different results of biochemical methods. On biochemical method one identified: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, and *L. sp*, while in PCR, *L. reuteri*, *L. salivarius* and *L.sp*. All *Lactobacillus* species isolated from poultry crop and cecum showed samples which inhibited *Salmonella* Enteritidis fagotype 4, *S. Enteritidis* fagotype 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* and *S. Senftenberg*.

Key words: Identification, *Lactobacillus*, PCR, inhibition, *Salmonella*, poultry.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Geral	17
2.2. Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Exclusão competitiva	21
3.2. Probióticos	23
3.3. Reação em Cadeia de Polimerase	25
3.4. Ação inibitória <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> frente a patógenos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Local	38
4.2. Aves	38
4.3. Delineamento experimental	38
4.3.1. Cepas de referência	38
4.3.2. Coleta, condições de cultivo e semeadura	39
4.3.3. Identificação do gênero <i>Lactobacillus</i>	39
4.3.4. Testes bioquímicos	40
4.3.5. Teste bioquímico API 50 CHL	41
4.3.6. PCR	42
4.3.6.1. Extração do DNA Bacteriano	42
4.3.6.2. Quantificação do DNA	43
4.3.6.3. Normalização das amostras	43
4.3.6.4. Primers	44
4.3.6.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	45
4.3.6.6. Condições de amplificação	48
4.3.6.7. Detecção do produto amplificado	48
4.3.7. Avaliação <i>in vitro</i> das espécies de <i>Lactobacillus</i>	49
4.3.7.1. Cepas de <i>Salmonella</i>	49
4.3.7.2. Cultivo das cepas de <i>Salmonella</i>	49
4.3.7.3. Cultivo para inibição	49

4.3.7.4. Plaqueamento	50
4.3.7.5. Teste de inibição <i>in vitro</i>	50
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6. RESULTADOS	52
6.1. Testes de triagem para identificação do gênero <i>Lactobacillus</i>	52
6.2. Bioquímico	53
6.3. Teste bioquímico API 50 CHL	54
6.4. PCR	55
6.5. Comparação das metodologias empregadas para identificação de <i>Lactobacillus</i>	56
6.6. Eletroforese em gel de agarose dos amplificadores de DNA	59
6.7. Avaliação da inibição <i>in vitro</i> das espécies de <i>Lactobacillus</i> frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	65
7. DISCUSSÃO	73
7.1. Isolamento de <i>Lactobacillus</i>	73
7.2. Testes fisiológicos, bioquímicos e API 50 CHL	75
7.3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	77
7.4. Ação inibitória <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> frente a patógenos	80
8. CONCLUSÕES	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Provas de triagem das amostras isoladas de ingluvío e cecos de aves.	40
Tabela 2. Primers para identificação das espécies de <i>Lactobacillus</i> .	44
Tabela 3. Reação utilizada para amplificação das amostras de DNA no multiplex PCR.	45
Tabela 4. Reação utilizada para amplificação das amostras de DNA na identificação das espécies do grupo <i>L.acidophilus</i> .	46
Tabela 5. Reação utilizada para amplificação das amostras de DNA na identificação de <i>L.acidophilus</i> .	47
Tabela 6. Programa para amplificação das amostras de DNA no multiplex PCR, grupo <i>L. acidophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> .	48
Tabela 7. Identificação das espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas do ingluvío, através do método bioquímico.	53
Tabela 8. Identificação das espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas dos cecos, através do método bioquímico.	53
Tabela 9. Avaliação das cepas de referência e amostras isoladas de aves (AIA) testadas no API 50 CHL.	54
Tabela 10. Amostras isoladas do ingluvío, identificadas através da PCR.	55
Tabela 11. Amostras isoladas dos cecos, identificadas através da PCR.	55
Tabela 12. Valores percentuais (%) de cada espécie de <i>Lactobacillus</i> , identificadas através dos métodos bioquímico e PCR.	56
Tabela 13. Avaliação entre os métodos bioquímico e PCR, para identificação de <i>L. fermentum</i> e diferenciação entre <i>L. reuteri</i> , provenientes do ingluvío (I) e cecos (C) de aves.	57
Tabela 14. Identificação de <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> e <i>L. salivarius</i> através do multiplex PCR.	60
Tabela 15. Identificação de <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> e <i>L. salivarius</i> através do multiplex PCR.	61
Tabela 16. Identificação do grupo <i>L. acidophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> através da PCR.	63

Tabela 17. Médias dos halos de inibição formados por <i>Lactobacillus reuteri</i> isolados do inglúvio de aves frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	65
Tabela 18. Médias dos halos de inibição formados por <i>Lactobacillus reuteri</i> isolados dos cecos de aves frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	66
Tabela 19. Médias das repetições dos halos (cm) de inibição formados por <i>Lactobacillus reuteri</i> provenientes do inglúvio (I) e cecos (C) frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	66
Tabela 20. Médias dos halos de inibição formados por <i>Lactobacillus salivarius</i> isolados do inglúvio de aves frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	67
Tabela 21. Médias dos halos de inibição formados por <i>Lactobacillus salivarius</i> isolados dos cecos de aves frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	67
Tabela 22. Médias das repetições dos halos (cm) de inibição formados por <i>Lactobacillus salivarius</i> provenientes do inglúvio (I) e cecos (C) frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	68
Tabela 23. Médias dos halos de inibição formados por <i>Lactobacillus</i> sp. isolados do inglúvio de aves frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	69
Tabela 24. Médias dos halos de inibição formados por <i>Lactobacillus</i> sp. isolados dos cecos de aves frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	69
Tabela 25. Médias das repetições dos halos (cm) de inibição formados por <i>Lactobacillus</i> sp. provenientes do inglúvio (I) e cecos (C) frente as cepas de <i>Salmonella</i> .	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. API 50 CHL para identificação de <i>Lactobacillus</i> .	41
Figura 2. Amostra de <i>Lactobacillus reuteri</i> . Coloração de Gram (1000x).	52
Figura 3. Amostra de <i>Lactobacillus salivarius</i> . Coloração de Gram (1000x).	52
Figura 4. Amostras isoladas do ingluvío, identificadas através dos métodos bioquímico e PCR.	58
Figura 5. Amostras isoladas dos cecos, identificadas através dos métodos bioquímico e PCR.	58
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados no multiplex PCR, com primers para <i>L. fermentum</i> (Fer3/ Fer4), <i>L. reuteri</i> (Reu1/ Reu2) e <i>L. salivarius</i> (Sal1/ Sal2). Marcador de PM 50 pb coluna (1), cepas de referência, amplificados de 192 pb <i>L. fermentum</i> (2), 303 pb <i>L. reuteri</i> (3) e 411pb <i>L. salivarius</i> (4), amplificados das AIA (5,6,7,8,10,11,12 e 13) 303 pb, nenhum amplificado (9) e controle negativo (14).	60
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados no multiplex PCR, com primers para <i>L. fermentum</i> (Fer3/ Fer4), <i>L. reuteri</i> (Reu1/ Reu2) e <i>L. salivarius</i> (Sal1/ Sal2). Marcador de PM 100 pb coluna (1), cepas de referência, amplificados de 192 pb <i>L. fermentum</i> (2), 303 pb <i>L. reuteri</i> (3) e 411pb <i>L. salivarius</i> (4), produtos amplificados pb das AIA (5,6,7,8,9,10,14,15,17,18 e 23) 411pb, nenhum produto amplificado (11,12, 13,16, 19, 20, 21 e 22) e controle negativo (24).	62
Figura 8 . Eletroforese em gel de agarose para análise da PCR, primers para grupo <i>L. acidophilus</i> (LU-1'/ Lac2). Marcador de PM 100 pb coluna (1), cepa de referência, produto amplificado de 300 pb para o grupo <i>L. acidophilus</i> (2), nenhum produto amplificado das AIA (3,4,5,6 e 7) e controle negativo (8).	64
Figura 9 . Eletroforese em gel de agarose para análise da PCR, primers para <i>L. acidophilus</i> (Lac1/ 23-10C). Marcador de PM 100 pb coluna (1), cepa de referência, produto amplificado de 210 pb para <i>L. acidophilus</i> (2), nenhum produto amplificado das AIA (3,4,5,6 e 7) e controle negativo (8).	64
Figura 10. Halo de inibição formado por <i>Lactobacillus reuteri</i> frente a <i>Salmonella Pullorum</i> .	71
Figura 11. Halo de inibição formado por <i>Lactobacillus salivarius</i> frente a <i>Salmonella Enteritidis</i> PT4.	71
Figura 12. Halo de inibição formado por <i>Lactobacillus salivarius</i> frente a <i>Salmonella Typhimurium</i> .	72
Figura 13. Halo de inibição formado por <i>Lactobacillus</i> sp frente a <i>Salmonella Enteritidis</i> fagotipo 28.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EC Exclusão Competitiva

CCT Coleção de Cultura Tropical

KCTC Korean Collection for Types Cultures

MRS DeMan Rogosa Sharpe

TSI Tríplice Sugar Iron

AIA Amostras Isoladas de Aves

PCR Reação em Cadeia de Polimerase

mL Mililitro

µL Microlitro

µg Micrograma

ng Nanograma

mg Miligrama

mM Milimolar

µM Micromolar

M Molar

U Unidade

[] Concentração

PM Peso molecular

pb Pares de base

dNTPs Desoxirribonucleotídeos

DNA Ácido desoxirribonucléico

UV Ultra violeta

CTAB Cetyltrimethyl ammonium bromide

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

TE Tris EDTA

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são denominados produtos essencialmente naturais, e não determinam resíduos nos produtos de origem animal, o que já os coloca em melhor posição em todos os segmentos da cadeia de produção e consumo de proteína animal.

Em aves, dois fatos isolados tornaram esse assunto mais evidente: primeiro foi à publicação de Nurmi & Rantala em 1973, mostrando que fezes de aves adultas normais tinham efeito protetor contra a infecção de pintos por *Salmonella*, e mais recentemente, o crescimento em todo o mundo da infecção humana por *Salmonella* Enteritidis, tendo como origem produtos avícolas contaminados.

Várias espécies bacterianas compõem a microbiota normal do trato respiratório, inglúvio e cecos, evidenciando-se sempre a presença benéfica do gênero *Lactobacillus* spp. Sendo o inglúvio e os cecos os principais locais para colonização por *Salmonella* spp. em aves, faz-se necessário estudarmos as espécies de *Lactobacillus* comumente encontradas nestes segmentos, avaliando o seu efeito protetor contra *Salmonella* spp. Atualmente há grande interesse nas

aplicações de microrganismos antagonistas, ressaltando a preferência de espécies bacterianas produtoras de bacteriocinas, capazes de proteger a microbiota nativa de humanos e animais contra infecções por microrganismos indesejáveis.

A ausência de métodos mais eficazes de controle das salmoneloses aviárias e das contra-indicações da antibioticoterapia, deu origem a busca de métodos alternativos, dentre eles o uso de probióticos e produtos de Exclusão competitiva (EC).

O desenvolvimento de métodos baseados na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem aberto novas possibilidades para identificação precisa e rápida das bactérias ácido lácticas (LAB), que são comumente utilizadas na indústria leiteira e fermentação de alimentos. É crescente a utilização de métodos baseados em biologia molecular devido a sua eficácia para determinação de espécies do gênero *Lactobacillus* spp., presente na microbiota normal do intestino de humanos.

A constante evolução técnica pela qual passa a avicultura mundial tem possibilitado a obtenção de produtos avícolas de baixo custo, saudáveis e altamente nutritivos, redundando no evidente favorecimento ao consumidor final. Consumidor esse, que pode ser beneficiado, mediante a redução do uso de antibióticos como promotores de crescimento pela indústria avícola, paulatinamente substituídos pelos probióticos.

O interesse em *Lactobacillus* tem sido estimulado recentemente pelo seu uso em produtos benéficos à saúde do homem e de animais (probiótico). A maioria dos probióticos contém uma ou mais linhagens de bactérias ácido lácticas, incluindo o gênero *Lactobacillus*, que fazem parte da microbiota normal e exibem atividade contra bactérias patogênicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar *Lactobacillus* spp. presentes no ingluvío e cecos de aves de produção, identificando-os através dos métodos bioquímico e PCR. Submeter as cepas isoladas a avaliação da sua capacidade de apresentar atividade inibitória *in vitro* contra cepas de *Salmonella*.

2.2. Específicos

2.2.1. Isolar *Lactobacillus* spp., do ingluvío e cecos de aves matrizes reprodutoras.

2.2.2. Identificar as espécies de *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* através dos métodos bioquímico e PCR.

2.2.3. Correlacionar a presença das espécies de *Lactobacillus* com o ingluvío e cecos, respectivamente.

2.2.4. Comparar e verificar a eficácia das metodologias empregadas para identificação.

2.2.5. Avaliar a capacidade *in vitro* das espécies de *Lactobacillus* isoladas, em interferir no crescimento de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A microbiota intestinal de aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (TANNOCK, 1998). Geralmente os primeiros gêneros e espécies bacterianas que colonizam o trato intestinal persistem ao longo da vida do hospedeiro, passando a compor a microbiota intestinal (MILES, 1993). Dentre os principais gêneros bacterianos que são identificados nesta microbiota, observa-se invariavelmente a presença de *Lactobacillus* spp. (SALANITRO *et al.*, 1978; IMPEY *et al.*, 1982; OYARZABAL e CONNER, 1995). A microbiota das aves tende a permanecer constante (GARRIGA *et al.*, 1998), sendo evidente que o equilíbrio desta reflete diretamente na saúde do hospedeiro (MILES, 1993). Fatores como alimento, água (TANNOCK & SAVAGE, 1974), estresse (FULLER, 1989), imunossupressão e administração de antibióticos (HAVENNAR & HUIS VELDT, 1992), podem quebrar a estabilidade desta microbiota, favorecendo a colonização por patógenos no intestino (GARRIGA *et al.*, 1998).

Bactérias patogênicas indesejáveis, tais como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp., são os principais patógenos que colonizam o trato intestinal das aves (GARRIGA *et al.*, 1998). A infecção e colonização das aves por *Salmonella* spp., representando uma fonte de patógenos em produtos avícolas (TAUXE, 1991) e *Campylobacter* spp., responsável por quadros de

gastreenterite em humanos, são relatados em diversos países (MORISHITA *et al.*, 1997).

Os sorovares mais freqüentes, especialmente na farinha de carne, foram semelhantes aos relatos em outros rastreamentos epidemiológicos no Brasil, ou mesmo no exterior. *S. Anatum*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg* e *S. Agona* são sorovares extremamente presentes, sendo comumente encontrados em matéria-prima, ração e dieta de maneira geral (HACKING *et al.*, 1978; BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 1984, 1989, 1993; FALCÃO *et al.*, 1993; VELDMAN *et al.*, 1995). O grande número de sorovares encontrado na farinha de carne reforça que a contaminação da matéria-prima/ ração seja causa primária da transmissão de *Salmonella* (BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 1989; HOFER *et al.*, 1997).

Os sorotipos de *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* têm sido implicados em aproximadamente 50% dos surtos de salmonelose em humanos nos Estados Unidos, devido ao consumo de alimentos contaminados (SCHOENI *et al.*, 1995).

A administração de microrganismos da microbiota intestinal de aves pode determinar alguma proteção às aves contra a colonização por alguns patógenos, como *Salmonella* spp. (NURMI e RANTALA, 1973; SCHNEITZ, 1992; ZIPPRIN *et al.*, 1993; CORRIER *et al.*, 1995; ANDREATTI FILHO *et al.*, 1997, 1998), *Escherichia coli* (GILLILAND & SPECK 1977; JIN *et al.*, 1996) e *Campylobacter* spp. (BAILEY, 1993), sendo extremamente importante o estudo da microbiota de aves, bem como a ação antimicrobiana produzida por bactérias como *Lactobacillus* spp. (COCCONCELLI, 1993). Os *Lactobacillus* spp. pertencem a família *Lactobacillae*, fazendo parte da microbiota intestinal de aves e

mamíferos, incluindo o homem. De acordo com FULLER (1973), os *Lactobacillus* possuem funções benéficas que podem suprimir bactérias patogênicas indesejáveis do intestino. É importante identificar as espécies de *Lactobacillus* spp. presentes no ecossistema microbiano e quais apresentam potencial efeito protetor (SONG *et al.*, 2000).

A primeira publicação demonstrando as funções benéficas dos *Lactobacillus* foi de METCHNIKOFF (1907) que observou maior longevidade em agricultores búlgaros que consumiram leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus*, o que levou à suposição de RETTGER & CHAPLIN (1921) de que esse efeito era proveniente da colonização intestinal pelo *L. acidophilus*. NURMI & RANTALA (1973), demonstraram que a microbiota de aves adultas normais apresentava efeito protetor em pintos contra a infecção por *Salmonella* spp. e, TORTUERO (1973) indicando melhoria nos índices zoeconômicos, como melhor conversão alimentar e aumento no ganho de peso em aves que receberam *L. acidophilus*, foram os trabalhos pioneiros relatando os efeitos benéficos de bactérias intestinais em relação a aves, abrindo caminho para uma série de investigações sobre o tema. Os *Lactobacillus* representam importantes componentes da microbiota do trato respiratório (KAWACUCHI *et al.*, 1991), inglúvio (SARRA *et al.*, 1992) e intestino de aves, produzindo uma efetiva barreira contra a colonização por patógenos em aves e conseqüentemente reduzindo a contaminação de produtos avícolas que servem como alimentos (GARRIGA *et al.*, 1998). Substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (COCCONCELLI, 1993), produzidas por bactérias

presentes na microbiota intestinal, especialmente os *Lactobacillus* inibem o crescimento de várias bactérias (CHAVES *et al.*, 1999).

As bacteriocinas são proteínas bacterianas, produzidas por bactérias gram-positivas (especialmente *Lactococcus* e *Lactobacillus*), apresentando um espectro inibitório mais ativo do que as colicinas, com poder de ação contra outras bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas (BLACKBURN *et al.*, 1991). São produzidas por espécies homofermentativas (REEVES, 1965) e heterofermentativas do gênero *Lactobacillus* spp. KLERK & COETZEE (1961), ressaltando a importância da presença de espécies de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocinas na composição de probióticos ou produtos de exclusão competitiva (EC) (VICENT *et al.*, 1959; JIN *et al.*, 1997).

3.1. Exclusão competitiva

É definida como a habilidade de uma população de microrganismos de se estabelecer no trato digestivo, podendo apresentar maior sucesso em um determinado ambiente ou ser produtora de algum metabólito que seja tóxico para outra população de microrganismos (NURMI & RANTALA 1973; DAY, 1992).

O bloqueio dos sítios de ligação (receptores) na mucosa entérica pelas bactérias intestinais, pode reduzir a área de interação nos cecos pelas bactérias patogênicas. BAILEY (1993) e JIN *et al.* (1996) concluíram que a ocupação física dos sítios intestinais pela microbiota intestinal, especialmente *Lactobacillus* spp., poderia ser mais importante que outros fatores propostos para EC. Nos últimos anos, evidências clínicas convincentes da eficácia de probióticos

ou consumo oral de preparações bacterianas, diante de distúrbios gastrintestinais têm sido relatadas (SALMINEN *et al.*, 1998). A colonização do trato gastrintestinal pelos microrganismos probióticos e sua adesão à mucosa têm sido consideradas como fatores imprescindíveis nas ações dos probióticos (HUIS IN'T & SHORTT, 1996).

KURZAK *et al.* (1998), realizaram vários tratamentos para isolamento de *Lactobacillus* do ingluvío de aves, e observaram que bactérias não aderentes podem ser encontradas, mas quando realizaram lavagem e raspado das células epiteliais do ingluvío, obtiveram como resultado um número maior de bactérias, mostrando que estas possuem propriedades adesivas. As bactérias que habitam o trato intestinal podem estabelecer-se de duas formas: em íntima associação com o epitélio ou livre na luz intestinal, mas multiplicando-se mais rapidamente do que sua eliminação pelo peristaltismo intestinal. Esses mecanismos ocorrem, por exemplo, com algumas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus* (MILES, 1993). Outras espécies bacterianas não apresentam capacidade de aderir ao epitélio intestinal, tampouco se multiplicam em tempo que compense a eliminação pelo peristaltismo, mas permanecem no intestino agregando-se a outras bactérias, que por sua vez estão aderidas à mucosa entérica (GUSILS *et al.*, 1999). De acordo com PASCUAL *et al.* (1999) uma amostra de *L. salivarius* resistente a rifampicina, isolada do ingluvío de galinhas foi selecionada devido ao potencial probiótico, pelo seu alto grau de adesão nas células epiteliais do intestino de galinhas, atividade antagonista contra algumas bactérias patogênicas e competitividade *in vivo*.

Segundo ERHMANN *et al.* (2002) são dois mecanismos possíveis para os efeitos benéficos das bactérias ácido lácticas (LAB) sobre distúrbios

gastrintestinais: produção de substâncias antimicrobianas tais como ácido láctico e bacteriocinas, aderência da mucosa e co-agregação para formar uma barreira que previna a colonização por patógenos.

CONWAY *et al.* (1987) e STRAVIC (1987) enfatizaram que bactérias pertencentes a microbiota intestinal normal, especialmente *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., formam uma barreira física às bactérias patogênicas pelo preenchimento dos sítios de ligação, respaldando a teoria de que esse mecanismo possa ser fator primário à EC (FULLER & GIBSON, 1997; JIN *et al.*, 1997). Alguns gêneros de bactérias intestinais como os *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos (LEE *et al.*, 1993), ativação de macrófagos (SEKINE *et al.*, 1994), proliferação de células T (YASUI & OHWAKI, 1991) e produção de interferon (FULLER & GIBSON, 1997), entre outros. Entretanto, o verdadeiro mecanismo, pelo qual essas bactérias estimulam o sistema imune ainda permanece com muitos pontos obscuros (TANNOCK, 1998).

3.2. Probióticos

Os primeiros a utilizarem o termo probiótico foram LILLY e STILL (1965), observando a ação de microrganismos como promotores de crescimento. FULLER (1989) definiu probiótico como suplemento alimentar de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, por meio do equilíbrio da microbiota

intestinal, sendo usados como promotores de crescimento e substituindo o uso de antibióticos e químicos sintéticos na alimentação.

HAVENNAR *et al.* (1992), complementando a citação de FULLER (1989), definiram probiótico como cultura pura ou composta de microrganismos vivos, que quando fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota normal. Tentativas têm sido feitas para definir os microrganismos isolados do intestino (MEAD & IMPEY 1984; STRAVIC *et al.*, 1987), para serem utilizados para prevenção (IMPEY *et al.*, 1982; IMPEY *et al.*, 1984; STRAVIC *et al.*, 1985; GLEESON *et al.*, 1986), tendo como um dos critérios a seleção de bactérias potencialmente protetoras (MEAD & IMPEY, 1987), e estudando os fatores que indicam a sua função probiótica e os benefícios para o hospedeiro (KLAENHAMMER *et al.*, 1998).

A falha de alguns produtos probióticos pode ser atribuída a inabilidade das amostras em colonizar e sobreviver no trato gastrintestinal, ou sua incapacidade para excluir cepas patogênicas (PASCUAL *et al.*, 1999). O uso de preparações indefinidas pode resultar na transmissão de qualquer patógeno. Esforços têm sido feito para desenvolver misturas bacterianas definidas para utilização na comercialização (PASCUAL *et al.*, 1999).

MIYAMOTO *et al.* (2000) investigaram *Lactobacillus* quantitativa e qualitativamente na cloaca e vagina de aves de postura e sua habilidade para inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis. Observaram, além da predominância de *L. acidophilus*, *L. salivarius* e *L. fermentum*, que os *Lactobacillus* isolados da cloaca e da vagina também inibem *in vitro* o crescimento de *S. Enteritidis*.

De acordo com OYARZABAL & CONNER (1995), seis sorotipos de *Salmonella* (California, Enteritidis, Heidelberg, Mission, Senftenberg e Typhimurium) foram inibidos *in vitro* por bactérias selecionadas, incluindo *L. acidophilus* e *L. casei*, e JUVEN *et al.* (1991); HINTON *et al.* (1992); CHATEAU *et al.* (1993); OYARZABAL & CONNER (1995) e JIN *et al.* (1996) relataram que *Lactobacillus* inibem o crescimento de vários patógenos, incluindo *Salmonella* spp. As bactérias ácido lácticas (LAB) nativas do intestino, incluindo *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., inibem *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. (JUVEN *et al.*, 1991, 1992).

O crescimento da inquietação pública quanto ao uso de antibióticos nas rações para animais, tem estimulado o interesse pelos probióticos e produtos de EC como terapia alternativa (CHAVES *et al.*, 1999), por excluir a colonização de patógenos intestinais (MORISHITA, 1997) e promover o balanço da microbiota intestinal (FULLER, 1989). O interesse da indústria na seleção de *Lactobacillus* com propriedades benéficas à saúde, vem crescendo rapidamente (YUN-KUN *et al.*, 1995). Critérios para a seleção de amostras probióticas específicas têm sido estudadas (HAVENNAR & HUIS VELDT, 1992; MORELLI, L 1994).

3.3.Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As técnicas da biologia molecular utilizadas para diagnóstico, são baseadas no princípio de hibridação e replicação de ácidos nucleicos permitindo a detecção e caracterização de microrganismos (IKUTA, 1999). As bactérias ácido

láticas, especialmente os *Lactobacillus*, compõem a microbiota normal do intestino e trato urogenital de humanos e animais, sendo comumente utilizados pela indústria leiteira e de fermentação de alimentos (MOLIN *et al.*, 1993).

O gênero *Lactobacillus* é composto por mais de 60 espécies, sendo que a identificação destas, baseada em critérios fisiológicos e bioquímicos é ambígua e complicada (KANDLER & WEISS, 1986; NOUR, 1998). A identificação de *Lactobacillus* usando métodos bioquímicos é notoriamente difícil porque são exigidos vários testes de fermentação (HAMMES & VOGEL, 1995). A coloração de Gram, catalase, produção de gás em glicose e ausência de H₂S em ágar Tríplice Sugar Iron (TSI), são considerados como métodos auxiliares na caracterização do gênero *Lactobacillus* (PELCZAR *et al.*, 1981; SHARPE, 1981; COLLINS & HARTLEIN, 1982; SNEATH *et al.*, 1986).

A concentração de células no meio parece exercer uma forte influência no padrão de fermentação dos *Lactobacillus*, dando resultados falso negativos após 24-48 horas de incubação (VALDEZ *et al.*, 1993).

Segundo COLLINS e HARTLEIN (1982) para o isolamento de *L. acidophilus* as temperaturas mínimas estão entre 15 a 22°C e máxima entre 45 a 48°C, BUCHANAN *et al.*, (1974) consideraram como temperaturas ótimas de 35 a 38°C. Contudo, MIKOLAJCIK e HAMDAN (1975) identificaram uma cepa (ATCC 11506) que cresceu rapidamente a 32°C.

Os *Lactobacillus* são classificados em três grupos: obrigatoriamente homofermentativo, que fermenta hexoses para ácido láctico; heterofermentativo facultativo, que fermenta hexoses para ácido láctico somente ou para ácido láctico

juntamente com ácido acético, etanol e ácido fórmico sobre limitação da glicose e obrigatoriamente heterofermentativo, fermentando hexoses para ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, e pentoses para ácido láctico e ácido acético (POT *et al.*, 1994). Os testes bioquímicos são muito usados para uma primeira determinação de bactérias ácido lácticas (LAB), embora para uma identificação mais precisa, métodos baseados na biologia molecular são recomendados (MORISHITA & SHIROMIZU, 1986; SCHILLINGER & LUCKE, 1987). De MARTINIS (2002) classificou a cepa *L. sake* de acordo com características fisiológicas e bioquímicas, mas esta espécie não pôde ser identificada pelo API 50 CHL, relatando que é insatisfatória a utilização do padrão de fermentação de carboidratos como único critério para identificação de bactérias ácido lácticas (LAB), porque ocorre freqüentemente variação de fermentações. Os testes bioquímicos são muito usados para uma identificação preliminar das LAB, embora a leitura seja subjetiva. As técnicas baseadas na biologia molecular são menos sujeita a erros, e os resultados são mais rápidos e seguros.

MORISHITA & SHIROMIZU (1986) também encontraram dificuldades para a identificação das LAB somente com base no padrão de fermentação de carboidratos. Segundo CHAGNAUD *et al.* (2001) a comparação utilizada na identificação de *Lactobacillus* através da fermentação de carboidratos pelo API 50 CHL e pela PCR apresentaram resultados diferentes para algumas espécies. O *L. casei* e o *L. salivarius* não puderam ser determinados pelo API 50 CHL, enquanto o *L. reuteri* foi identificado pelo mesmo como *L. fermentum*. Os resultados apresentados pela PCR provou ser mais discriminativa do que o API

50 CHL, na identificação das cepas de referência para determinação das espécies.

A variação biológica entre diferentes espécies de *Lactobacillus* pode ser considerada como indicativo de uma larga extensão de citosina mais guanina no conteúdo de DNA de diferentes espécies (32 mol% a 53mol %) MOLIN *et al.* (1992). Atualmente, as técnicas moleculares são importantes ferramentas taxonômica tais como mol% de G+C do conteúdo do DNA, estudos de hibridação DNA-DNA e seqüências do RNA ribossomal (rRNA), resultando em alterações na taxonomia das LAB (SCHLEIFER, 1987).

A classificação das LAB permanece inconstante, que por sua vez estimula intenso estudo taxonômico envolvendo as características fenotípicas e filogenéticas das bactérias (VANDAMME *et al.*, 1996) e todas estas dificuldades taxonômicas impedem a identificação individual das espécies para compor um probiótico (ANNUK *et al.*, 2003)

De acordo com KANDLER E WEISS (1986), *L. reuteri* e *L. fermentum* são difíceis de distinguir através de testes fisiológicos convencionais, mesmo eles não sendo geneticamente relacionados, como indicado pela sua diferença no mol% de G+C do DNA (40-42 e 52-54, respectivamente). As maiores alterações na taxonomia bacteriana em geral iniciaram-se com a determinação do conteúdo G+C do DNA bacteriano e o progresso das técnicas para estudos da relação fenotípica são baseados nas análises de seqüências do 16S e 23S rRNA. A informação genética dessas moléculas é altamente conservada e apropriada para determinar a relação das bactérias (STILES *et al.*, 1997).

Dentre os *Lactobacillus* heterofermentativo intestinal, o *L. fermentum* foi considerado por LERCHE e REUTER (1962) como espécie dominante no intestino, mas KLANDER *et al.*, (1980) descreveram este biótipo, de acordo com a homologia DNA-DNA como uma nova espécie heterofermentativa denominada *L. reuteri*.

SARRA *et al.*, (1979) classificaram o *L. reuteri* como espécie heterofermentativa dominante no intestino de vacas. Desta forma o *L. reuteri* pode ser considerado a principal espécie de *Lactobacillus* do intestino (KANDLER e WEISS, 1986). As espécies de *L. fermentum* e *L. reuteri* são fenotipicamente relacionadas e a diferenciação baseada em métodos bioquímicos é difícil (REUTER 1997). A técnica molecular é uma ferramenta utilizada para diferenciar estas duas espécies, sendo importante na determinação das espécies para a taxonomia e também favorecendo seguro biotecnológico (KLEIN *et al.*, 1998).

MOLIN *et al.* (1992), utilizando o API 50 CHL, não conseguiram diferenciar *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. crispatus* e *L. acidophilus* isolados da mucosa intestinal de ratos, contudo estas diferiram das cepas padrão. Segundo KANDLER e WEISS (1986); BORCH & MOLIN (1998); a identificação de *Lactobacillus* baseada na fermentação de carboidratos é em geral duvidosa, estas quatro espécies não podem ser diferenciadas somente com base na fermentação de carboidratos. Entretanto, a identificação destas espécies através de técnicas moleculares é baseada na determinação de seqüências de bases de ácidos nucléicos, sendo considerada confiável (NISSEN & DAINITY, 1995), usando seqüências do DNA ribossomal (rDNA) do 16S, os *Lactobacillus* têm sido

classificados dentro de cinco grupos filogenéticos: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri* e *L. plantarum* (SCHLEIFER & LUDWIG, 1995).

KLEIN *et al.* (1998) relataram que a identificação das espécies do grupo *L. acidophilus* usando somente características bioquímicas e fisiológicas é duvidosa, considerando que as espécies não podem ser diferenciadas por métodos clássicos. O grupo *L. acidophilus*, consiste de outras espécies como *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* e *L. jonsonii* identificadas através da análise de homologia de DNA-DNA (JOHNSON *et al.*, 1980; LAUER *et al.*, 1980 e FUJISAWA *et al.*, 1992; POT *et al.*, 1993).

A avaliação realizada através do 16S rDNA por LAN *et al.* (2000) da microbiota dos cecos de aves, tiveram como resultados dentre as várias espécies de bactérias, a presença de *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. salivarius* e *L. reuteri* considerando estas espécies como as mais encontradas nos cecos de aves.

Segundo KLAENHAMMER *et al.* (1995) dentre os vários *Lactobacillus* intestinais, o *L. acidophilus* tem sido considerado como a espécie mais importante, desde o primeiro isolamento em 1900. Até 1980 os pesquisadores classificaram a espécie de *L. acidophilus* com base nas reações morfológicas e fenotípicas (MITSUOKA, 1992). Em 1980, o grupo *L. acidophilus* foi considerado ser completamente heterogêneo, esta espécie não é considerada a mais predominante em humanos, animais ou roedores (LAUER *et al.*, 1980). Em aves, as espécies comumente encontradas no intestino são *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, identificadas através da homologia DNA-DNA (KLAENHAMMER *et al.*, 1995), o *L. salivarius* é a espécie

predominante no ingluvío e conteúdo intestinal de galinhas jovens segundo GARRIGA *et al.* (1998).

O desenvolvimento de métodos baseados na PCR tem aberto novas possibilidades para identificação precisa e rápida das LAB (TORRIANE *et al.*, 1999), sendo encontrada em crescente aplicação na microbiologia de alimentos (DRAKE *et al.*, 1996). A importância das espécies de *Lactobacillus* nos processos industriais ou na saúde humana e animal, tem aumentado o estímulo no desenvolvimento da genética molecular para este gênero CHAGNAUD *et al.*, (2001).

Atualmente os genes do ácido ribonucléico do rRNA têm sido aceitos como ferramentas para a identificação e análise filogenética de bactérias (AMANN *et al.*, 1995). Sondas de hibridação e primers (iniciadores) que detectam a região 16S ou 23S do rRNA têm sido aplicados com sucesso na identificação e detecção de algumas espécies de *Lactobacillus* através da PCR (HERTEL *et al.*, 1991; DIMICHELE & LEWIS 1993). Os métodos moleculares baseados em ácidos nucleicos certamente serão marcantes na pesquisa de probióticos, nesta década (VAUGHAN *et al.*, 1999).

Experimentos *in vivo* têm sido realizados para demonstrar o papel benéfico das LAB na saúde de humanos e animais, mas são necessários métodos eficientes e simples para detectar e identificar as LAB (CHAGNAUD *et al.*, 2001). Hoje em dia os métodos taxonômicos são baseados na caracterização fenotípica (composição da parede celular, fingerprint da proteína, mobilidade eletroforética, etc.) e análises genotípicas (homologia DNA-DNA, PCR- RAPD, ribotipagem, etc.) (VANDAMME *et al.*, 1996; ZHONG *et al.*, 1998; TYNKKEYNEN *et al.*, 1999).

Dados relacionados com as seqüências do gene 16S ou regiões do espaço intergênico (ISR) dos genes 16S-23S, tem permitido a identificação das LAB usando oligonucleotídeos específicos como sondas (fluorescentes ou não) ou em testes da PCR (HENSIEK *et al.*, 1992; McSWEENEY *et al.*, 1993; BERTHIER & EHRLICH, 1998; NOUR *et al.*, 1998; TANNOCK *et al.*, 1999). Entretanto, a maioria destes métodos são caros, consomem tempo e não são adaptados à análise de rotina (CHAGNAUD *et al.*, 2001). Os oligonucleotídeos, que são complementares para regiões de 16S ou 23S rRNA, podem ser utilizados para identificação das LAB, que por sua vez não podem ser diferenciadas por simples testes fenotípicos (SCHLEIFER *et al.*, 1995).

Os métodos utilizados para caracterizar uma população bacteriana em animais incluem investigações morfológicas, fisiológicas e métodos do perfil plasmidial ou DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD). Mais recentemente, o RAPD tem sido aplicado para diferenciar as LAB usando um primer derivado do bacteriófago M13 (MITEVA *et al.*, 1992; VOGEL *et al.*, 1996).

Recentemente, a amplificação da PCR na região V2 – V3 do 16S do rDNA usando primers universal, seguida pela desnaturação em gradiente do gel de eletroforese (DDGE), têm sido aplicado para detectar e identificar amostras *Lactobacillus* gastrintestinais (WALTER *et al.*, 2000), entretanto, nenhuma destas técnicas parece ser prática para uma rápida identificação de *Lactobacillus* em diagnósticos laboratoriais (BAELE *et al.*, 2002). A ribotipagem é um método que pode identificar e classificar bactérias baseadas nas diferenças do rRNA, pois esta técnica gera uma impressão digital altamente reproduzível e precisa, que pode ser utilizada para classificar espécies de bactérias (De MARTINIS, 2002).

SONG *et al.*, (2000) utilizaram o multiplex PCR com vários pares de primers espécie-específicos que envolvem a amplificação de uma sequência conhecida, através de um único teste para identificação de espécies de *Lactobacillus* isoladas do intestino de humanos, sendo considerado um método de identificação simples, rápido e confiável.

3.4. Ação inibitória in vitro de Lactobacillus frente a patógenos

Surtos de salmonelose causados por *Salmonella* Enteritidis (SE) vem aumentando durante as duas últimas décadas e têm sido considerada importante questão de saúde pública e econômica (RODRIGUE *et al.*, 1990; DUGUID e NORTH, 1991). Muitas estratégias para prevenir a incidência de SE em alimentos contaminados vem sendo propostas, pois ainda desconhece-se método de prevenção totalmente eficaz. O conhecimento do mecanismo para colonização de SE nos ovos, é essencial para reduzir os riscos da saúde pública associados com o consumo de ovos infectados (MYIAMOTO *et al.*, 2000).

A SE pode causar infecção em reprodutoras e resultar na produção de ovos contaminados após interações com a microbiota nativa (MYIAMOTO *et al.*, 1997, 1998). Os *Lactobacillus* são predominantes na vagina de humanos, e sua presença é crucial para manter o equilíbrio ecológico da microbiota vaginal (REID *et al.*, 1990; HUDAULT *et al.*, 1997).

Na inibição da infecção ascendente dos órgãos genitais em mamíferos, a microbiota, especialmente os *Lactobacillus* da vagina, tem apresentado um importante papel (REDONDO-LOPEZ *et al.*, 1990; REID *et al.*, 1990; HUDAUT *et al.*, 1997). Contudo, há pouca informação sobre a microbiota normal dos órgãos genitais de aves (HARRY, 1963; JACOBS *et al.*, 1978; AGUIRE *et al.*, 1992) e o seu papel na infecção por SE.

MIYAMOTO *et al.* (1998) relataram que há possibilidade dos *Lactobacillus* exercerem um efeito protetor contra a ascendência da infecção por SE em fêmeas. *L. acidophilus* e *L. salivarius* foram isolados do conteúdo cloacal e muco vaginal, enquanto o *L. fermentum* foi isolado somente do conteúdo cloacal. As composições da microbiota da cloaca e vagina de aves parecem ser similares a do intestino. Muitos estudos (JUVEN *et al.*, 1991; HINTON *et al.*, 1992; CHATEAU *et al.*, 1993; OYARZABAL e CONNER, 1995; JIN *et al.*, 1996) reportaram que os *Lactobacillus* inibem o crescimento de vários patógenos, incluindo *Salmonella* spp. Em galinhas, para excluir *Salmonella* do intestino, o estabelecimento competitivo da microbiota não patogênica tem sido investigada (BABA *et al.*, 1991; JUVEN *et al.*, 1991).

Os mecanismos que os *Lactobacillus* utilizam para inibir o crescimento de outras bactérias *in vitro* são produção de peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos tais como ácido lático e ácido acético com a conseqüente redução do pH, e a produção de proteínas específicas como as bacteriocinas (HINTON *et al.*, 1992; CHATEAU *et al.*, 1993).

De acordo com MYIAMOTO *et al.* (2000) as espécies de *Lactobacillus* do conteúdo cloacal e muco vaginal inibiram a SE, mostrando uma

grande variedade de halos de inibição nestas espécies. Várias amostras de *L. salivarius* isoladas do conteúdo cloacal apresentaram halos de inibição de até 1,2cm, quando comparados com amostras de *L. acidophilus*. Contudo, não houve variação entre amostras da mesma espécie, bem como não foi observada diferença entre os *Lactobacillus* isolados da cloaca e vagina.

Tratamentos profiláticos com *L. acidophilus* reduzem a transmissão de *Salmonella* Typhimurium e a mortalidade de aves gnotobióticas, mas não reduzem o isolamento da mesma no ceco e reto (WATKINS e MILLER, 1983). Além do mais, culturas simples de *Lactobacillus* originado do ceco de aves não previnem consistentemente a colonização de *Salmonella* quando administrado oralmente (BARNES *et al.*, 1980). O uso de misturas de bactérias ao invés de culturas isoladas tem sido mais efetiva para controlar a colonização de *Salmonella* em aves jovens (IMPEY *et al.*, 1982).

Segundo OYARZABAL *et al.* (1995) bactérias selecionadas compreendendo *L. casei*, *L. acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus* sp. e *Bifidobacterium bifidum* exibiram halos de inibição contra *Salmonella* California, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Mission*, *S. Senftenberg* e *S. Typhimurium*.

A habilidade existente nas LAB para inibir várias bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas é bem conhecida, determinada por diferentes tipos de *Lactobacillus* incluindo *L. fermentum* (De KLERK e COETZEE, 1967; De KLERK e SMIT, 1967), *L. bulgaricus* (MITCHELL e KENWORTHY, 1976), *L. acidophilus* (HOSONO *et al.*, 1977; BAREFOOT e KLAENHAMMER, 1983), *L. reuteri* (ZACCONI *et al.*, 1985) e *L. plantarum* (ANDERSSON *et al.*, 1988). Estas

propriedades antagonistas são desejáveis em probióticos utilizados na alimentação animal. (CHATEAU *et al.*, 1993).

Os *Lactobacillus* parecem ser mais eficazes contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (TAGG *et al.*, 1976), mas resultados satisfatórios foram encontrados por (CHATEAU *et al.*, 1993), de amostras isoladas de um probiótico apresentando halos de inibição frente a *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* e APELLA *et al.* (1992) observaram atividade inibitória de *L. acidophilus* e *L. casei* contra *Shigella sonnei*.

REQUE *et al.* (2000) observaram que uma amostra isolada dos cecos de aves identificada como *L. fermentum*, apresentando atividade antimicrobiana frente a *S. Typhimurium*, mas não contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus*.

HUDAULT *et al.* (1997) avaliaram as propriedades antagonistas *in vitro* de *L. casei* cepa (GG) em modelo celular enterócito Caco-2 contra *S. Typhimurium* C5, observando que os *Lactobacillus* impedem a invasão da *Salmonella* no modelo celular. Os *Lactobacillus* demonstraram atividade inibitória com respeito à multiplicação de enteropatógenos (DRAGO *et al.*, 1997). Ainda não está claramente definido se os mecanismos antimicrobianos dos *Lactobacillus* diferem de acordo com a bactéria alvo ou estão associados à sua virulência. A atividade inibitória dos *Lactobacillus* contra comensais ou patógenos, seja Gram-negativos ou Gram-positivos parece ser muito variável (JACOBSEN *et al.*, 1999). As bacteriocinas produzidas pelas LAB tem atividade inibitória específica contra bactérias Gram-positivas (ABEE *et al.*, 1995), em contraste, os patógenos Gram-

negativos são mais sensíveis aos ácidos orgânicos produzidos pelas LAB (ALAKOMI *et al.*, 2000).

COSBY *et al.* (1997) avaliaram isolados bacterianos incluindo-se os *Lactobacillus* provenientes da moela e cecos de galinhas para atividade inibitória *In vitro* frente a *Salmonella* Typhimurium. Dentre os vários métodos de inibição eles utilizaram o spot-on-the-lawn e verificaram que este é capaz de oferecer reprodutibilidade rápida e resultados confiáveis, observando a inibição pela presença de halos. A seleção de amostras com propriedades inibitórias é importante para se produzir cultura definida e efetiva. A inclusão de bactérias que produzam substâncias antimicrobianas com atividade contra *Salmonella* melhorarão a eficácia dos produtos.

SAARELA *et al.* (2000) consideraram que vários critérios de seleção devem ser utilizados para seleção de amostras probióticas, que devem ser consideradas como seguras, funcionais e que tenha aplicabilidade tecnológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Ornitopatologia¹ e Patologia², para processamento das amostras em relação ao isolamento, inibição *in vitro* e identificação através da PCR.

4.2. Aves

Foram utilizadas 14 aves matrizes reprodutoras. 10 da linhagem Ross, sendo quatro aves de 52 semanas e seis de 65 semanas de idade, duas da linhagem Cobb de 24 semanas e duas aves de postura comercial da linhagem Hysex Brown de 63 semanas de idade, como doadoras de ingluvío e cecos.

4.3. Delineamento experimental

4.3.1. Cepas de referência

Foram utilizadas cepas de *Lactobacillus acidophilus* (KCTC)³, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* da Coleção de Cultura Tropical (CCT)⁴, e para verificação da sua pureza realizou-se o plaqueamento em ágar DeMan, Rugosa-Sharpe (MRS)⁵, com incubação a 37°C por 48 horas, selecionando-se colônias de cada espécie e submetendo-as às provas de morfologia (método de Gram), teste de catalase, produção de gás em glicose e sulfeto de hidrogênio (H₂S).

1- Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP-Campus Botucatu - SP.

2- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina -UNESP-Campus Botucatu-SP.

3- Korean Collection for Type Cultures. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) – Campinas - SP.

4- Coleção de Cultura Tropical. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" -Campinas-SP.

5- DIFCO.

4.3.2. Coleta, condições de cultivo e sementeira

Imediatamente após o sacrifício das aves, foram coletados, assepticamente, ingluvíos e cecos, que foram colocados individualmente em tubos contendo 10 mL de caldo MRS pH 6,5. Os tubos foram incubados em anaerobiose com sistema Anaerobac a 37°C por 48 horas e a 37°C e 45°C por 12 a 18 horas. Após este período os caldos foram semeados em placas de Petri contendo ágar MRS, posteriormente incubados a 37°C por 24 a 48 horas.

4.3.3. Identificação do gênero *Lactobacillus*

Foram selecionadas colônias isoladas, pequenas (2-5mm), lisas, brilhantes e sem pigmentos, submetidas as seguintes provas:

- morfologia, através da coloração de Gram (PELCZAR *et al.*, 1981),
- teste de catalase (SHARPE, 1981),
- produção de gás em glicose (COLLINS & HARTLEIN, 1982) e
- produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em Agar Tríplice Sugar Iron (TSI) (SNEATH *et al.*, 1986).

As amostras que apresentaram as seguintes características (Tabela 1) foram consideradas compatíveis com o gênero *Lactobacillus*.

Tabela 1. Provas de triagem das amostras isoladas de ingluvío e cecos de aves.

Gênero:	Coloração (Gram)	Teste Catalase	Glicose (Produção de gás)	TSI (Produção H ₂ S)
<i>Lactobacillus</i>	+	-	+	-

4.3.4. Testes bioquímicos

As colônias previamente identificadas com características do gênero *Lactobacillus*, foram submetidas a testes de fermentação de diferentes carboidratos.

- **Etapas A-** Os isolados foram semeados em caldo MRS modificado, sem extrato de carne e glicose, adicionando-se 0,002% de púrpura de bromocresol como indicador e acrescido de 1% de cada carboidrato (arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, glicose, lactose, manitol, maltose, manose, rafinose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose e xilose). As culturas foram incubadas a 37°C por 48 horas (KANDLER e WEISS, 1986; DAVIS, 1955).

- **Etapas B-** Todas as cepas de referência e uma amostragem das amostras isoladas de aves (AIA), foram semeadas no API 50 CHL[®], incubando-as aerobicamente a 37°C por 48 horas.

[®] Bio Mérieux, Many- I Eptile 09280, France.

4.3.5. Teste bioquímico API 50 CHL

Este método consiste na fermentação de 49 carboidratos individualmente (Figura 1). De acordo com os dados referentes à fermentação de cada carboidrato, foi realizada a interpretação através de um software Biomérieux Analytical products.

Figura 1. API 50 CHL para identificação de *Lactobacillus*.



4.3.6. PCR

4.3.6.1. Extração do DNA Bacteriano

O protocolo de extração de DNA, foi realizado segundo a metodologia descrita por OLIVEIRA *et al.* (2002).

Ao microtubo que continha 250µL da suspensão bacteriana proveniente do caldo MRS, foi adicionado 100µL de Cloreto de Sódio (NaCl) 5M e 100µL de Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) pré-aquecido a 65°C.

O microtubo, contendo a suspensão, foi agitado por 10 segundos até obter aspecto leitoso e foi posteriormente incubado por 10 minutos a 65°C. Após este período foi adicionado ao mesmo, 750µL de Clorofórmio¹-álcool-isoamílico² (24:1), agitado por 10 segundos com movimentos leves e em seguida foi centrifugado em temperatura ambiente por 5 minutos a 20.800 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 450 µL de etanol absoluto a - 20°C, incubando-o durante 10 minutos a - 20°C. Em seguida foi centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 20.800 x g, eliminando o álcool e acrescentando-se 500µL de etanol a 70% (temperatura ambiente), seguido do mesmo procedimento de centrifugação acima citado. O álcool foi eliminado novamente e o microtubo contendo o pelet foi submetido à secagem a 56°C no banho seco (Termolyne)³.

1- VETEC.

2- SYNTH.

3- Type 16500 – Dry Bath.

Após a completa secagem do pelet, foi adicionado 50µL de tampão de diluição (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA) pH 8,0; previamente aquecido a 56°C.

As amostras de DNA foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente armazenadas a - 20°C até a sua utilização na PCR. Em todas as análises foram utilizados controles positivos e negativos.

4.3.6.2. Quantificação do DNA

Foi realizada através do espectrofotômetro (Quant Gene II)*, utilizando 495µL de Tris EDTA (TE) pH 8,0, acrescido de 5 µL do DNA molde para avaliação da absorbância (A260), razão (A260/ A280) e concentração de DNA em µg/ µL.

4.3.6.3. Normalização das amostras

Nas amostras que apresentaram concentração de DNA maior do que 0,1µg/ µL foi realizado o cálculo com base nesta concentração, tendo como resultado a quantidade de TE e DNA necessárias para normalização, com volume final de 50 µL.

• Amersham Pharmacia Biotech.

4.3.6.4. Primers

Seqüências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Tabela 2. Primers para identificação das espécies de *Lactobacillus*.

Agente / Referência¹	Ident. Primer	Primers (5' – 3')	Produto
Espécies do Grupo <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lac 1 23-10C	CCTCTTCGCTCGCCGCTACT ATTGTAGAGCGACCGAGAAG	300 pb
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lac 2 LU-1'	TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC CCTTCCCTCACGGTACTG	210 pb
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Fer 3 Fer 4	ACTAACTTGACTGATCTACGA TTCAGTGCTCAAGTAATCATC	192 pb
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Reu 1 Reu 4	CAGACAATCTTTGATTGTTTAG GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC	303 pb
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Sal 1 Sal 2	AATCGCTAAACTCATAACCT CACTCTCTTTGGCTAATCTT	411 pb

1- SONG, Y.L *et al.* (2000).

4.3.6.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Multiplex PCR

A reação de amplificação com volume total de 25µL, foi realizada com três conjuntos de primers para identificação das espécies *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* (Tabela 3).

Tabela 3. Reação utilizada para amplificação das amostras de DNA no multiplex PCR.

Constituintes da reação		[] Inicial	1 x (mL)	[] Final
Água ultra pura (Mili-Q)		-	12,75	-
Tampão para PCR (buffer)		10 x	2,50	1,00 x
Cloreto de Magnésio		50 mM	1,25	2,50 mM
dNTPs		20 mM	0,25	0,20 mM
Iniciador 1S	Primer L fer3	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 1A	Primer L fer4	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 2S	Primer L reu1	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 2A	Primer L reu4	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 3S	Primer L sal1	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 3A	Primer L sal2	10 µM	1,00	0,40 µM
Enzima	Taq DNA	5 U/ µL	0,25	1,25 U/µL
Volume da amostra:	DNA	0,1µg/ µL	2,00	8,00 ng/µL
Volume total:		-	25,00µL	-

Grupo *Lactobacillus acidophilus*

A reação de amplificação com volume total de 25µL, foi realizada para as amostras que apresentaram resultado negativo no multiplex. Os primers Lac2 e LU-1' foram utilizados para identificação de *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. helveticus* e *L. jensenii* (Tabela 4).

Tabela 4. Reação utilizada para amplificação das amostras de DNA para identificação das espécies do grupo *L.acidophilus*.

Constituintes da reação		[] Inicial	1 x (mL)	[] Final
Água ultra pura (Mili-Q)		-	16,75	-
Tampão para PCR (buffer)		10 x	2,50	1,00 x
Cloreto de Magnésio		50 mM	1,25	2,50 mM
dNTPs		20 mM	0,25	0,20 mM
Iniciador 1S	Primer Lac 2	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 1A	Primer Lu-1'	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 2S		-	-	0,40 µM
Iniciador 2A		-	-	0,40 µM
Iniciador 3S		-	-	0,40 µM
Iniciador 3A		-	-	0,40 µM
Enzima	Taq DNA	5 U/ µL	0,25	1,25 U/µL
Volume da amostra:	DNA	0,1 µg/ µL	2,00	8,00 ng/µL
Volume total:		-	25,00 µL	-

Lactobacillus acidophilus

A reação de amplificação com volume total de 25µL, foi realizada com primers Lac1 e 23-10C para identificação da espécie (Tabela 5).

Tabela 5. Reação utilizada para amplificação das amostras de DNA para identificação de *L.acidophilus*.

Constituintes da reação		[] Inicial	1 x (mL)	[] Final
Água ultra pura (Mili-Q)		-	16,75	-
Tampão para PCR (buffer)		10 x	2,50	1,00 x
Cloreto de Magnésio		50 mM	1,25	2,50 mM
dNTPs		20 mM	0,25	0,20 mM
Iniciador 1S	Primer Lac 1	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 1A	Primer 23-10 C	10 µM	1,00	0,40 µM
Iniciador 2S		-	-	0,40 µM
Iniciador 2A		-	-	0,40 µM
Iniciador 3S		-	-	0,40 µM
Iniciador 3A		-	-	0,40 µM
Enzima	Taq DNA	5 U/ µL	0,25	1,25 U/µL
Volume da amostra:	DNA	0,1 µg/ µL	2,00	8,00 ng/µL
Volume total:	-		25,00µL	-

4.3.6.6. Condições de amplificação

O Programa utilizado para a amplificação¹ das amostras de DNA, consistiu de condições, temperatura, tempo e repetições na PCR, conforme a (Tabela 6).

Tabela 6. Programa para amplificação das amostras de DNA no multiplex PCR (*L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*), grupo *L. acidophilus* e *L. acidophilus*.

Condições	Temperatura	Tempo	Repetições
Pré-PCR	94°C	5'	1 vez
PCR	94°C	1'	40 vezes
	94°C	30''	
	72°C	1'	
Pós-PCR	72°C	7'	1 vez

Após o término do programa os tubos foram retirados do aparelho e mantidos sob refrigeração.

4.3.6.7. Detecção do produto amplificado

Eletroforese

Os produtos da PCR (8µL) foram acrescidos com 2µL da solução tampão de carregamento 10x com glicerol, e separados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10mg/mL), posteriormente visualizados em transiluminador com Ultra violeta (UV) e fotografados através do sistema de fotodocumentação². Os fragmentos foram identificados com base na utilização de marcadores de peso molecular (PM)³ de 50 e 100 pb.

1- Eppendorf – Mastercycler gradient..

2- Polaroid.

3- Invitrogen – Life Technologies, California.

4.3.7. Avaliação *in vitro* das espécies de *Lactobacillus*

4.3.7.1. Cepas de *Salmonella*

Foram utilizadas cepas de *Salmonella*¹ (*S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*), e avaliadas quanto à inibição do crescimento devido a presença de espécies de *Lactobacillus* provenientes do ingluvírio e cecos, previamente identificadas.

4.3.7.2. Cultivo das cepas de *Salmonella*

Cada cepa de *Salmonella* mantida em ágar nutriente foi suspensa em 10mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)², incubado aerobicamente a 37°C por 24 horas. Após este período, cada cepa foi semeada em ágar verde brilhante (AVB)³ seguindo-se mesma metodologia acima citada.

4.3.7.3. Cultivo para inibição

Foi realizado de acordo com a técnica spot-on-the-lawn (LEWUS *et al.*, 1991; SANTOS, 1993), com modificações.

As espécies de *Lactobacillus* foram semeadas em caldo MRS⁴ que foi incubado em microaerofilia a 37°C por 24 horas. Após este período o caldo MRS foi semeado em placas de Petri contendo aproximadamente 15mL de ágar MRS, através de inoculação em pontos,

1- Obtidos junto ao Laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-UNESP-Campus Botucatu- SP).

2- DIFCO.

3- DIFCO.

4- DIFCO.

sendo realizadas quatro repetibilidade para cada espécie, provenientes do ingluvío e cecos, incubando-as em microaerofilia a 37°C por 24 horas. Concomitantemente, cada cepa de *Salmonella* foi semeada em caldo BHI e incubada em aerobiose durante 12 horas a 37°C. Foram realizadas diluições decimais seriadas para determinar a UFC/mL de cada *Salmonella*. Após a incubação, foram transferidos 100µL da cultura com *Salmonella* para tubos contendo 5mL de BHI. Após a homogeneização, 1mL foi transferido para novo tubo contendo 5mL de BHI. Em seguida 750µL desta última solução, foram transferidos para novo tubo contendo 15mL de BHI acrescido de 0,87% de ágar ágar¹, previamente preparado e mantido em banho-Maria a 45°C.

4.3.7.4. Plaqueamento

Cada cepa de *Salmonella* acrescentada no ágar acima citado, foi dispensado sobre as placas cultivadas anteriormente com as espécies de *Lactobacillus*. Após a completa solidificação da camada superior, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas.

4.3.7.5. Teste de inibição *in vitro*

A inibição do crescimento de cada cepa de *Salmonella* por espécies de *Lactobacillus* provenientes do ingluvío e cecos, foi avaliada pelo diâmetro final da área de inibição, correspondendo à diferença entre o halo de inibição total e o diâmetro da colônia (CHATEAU, *et al.*, 1993).

1- DIFCO.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os métodos bioquímico e PCR para identificação dos isolados provenientes do ingluvío e cecos, foi determinada pelo teste de Mc Nemar e Qui-quadrado (ZAR, 1996).

A avaliação da atividade inibitória *in vitro* foi determinada pela medida dos halos em centímetros (cm), produzidos por cada espécie de *Lactobacillus* isolada do ingluvío e cecos em relação as cepas de *Salmonella*, baseando-se em quatro repetibilidade. Em relação ao diâmetro do halo, foi utilizada a análise de variância em blocos com aplicação do teste de Tukey, de comparação das médias, para estudos dos fatores: Cepas de *Salmonella* e segmentos (ingluvío e cecos) (ZAR, 1996).

6. RESULTADOS

6.1. Testes de triagem para identificação do gênero *Lactobacillus*.

Todas as amostras selecionadas e isoladas do ingluvío e cecos apresentaram-se Gram-positivas (Figuras 2 e 3), catalase negativa, produção de gás de glicose e H₂S negativo (TSI), sendo consideradas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

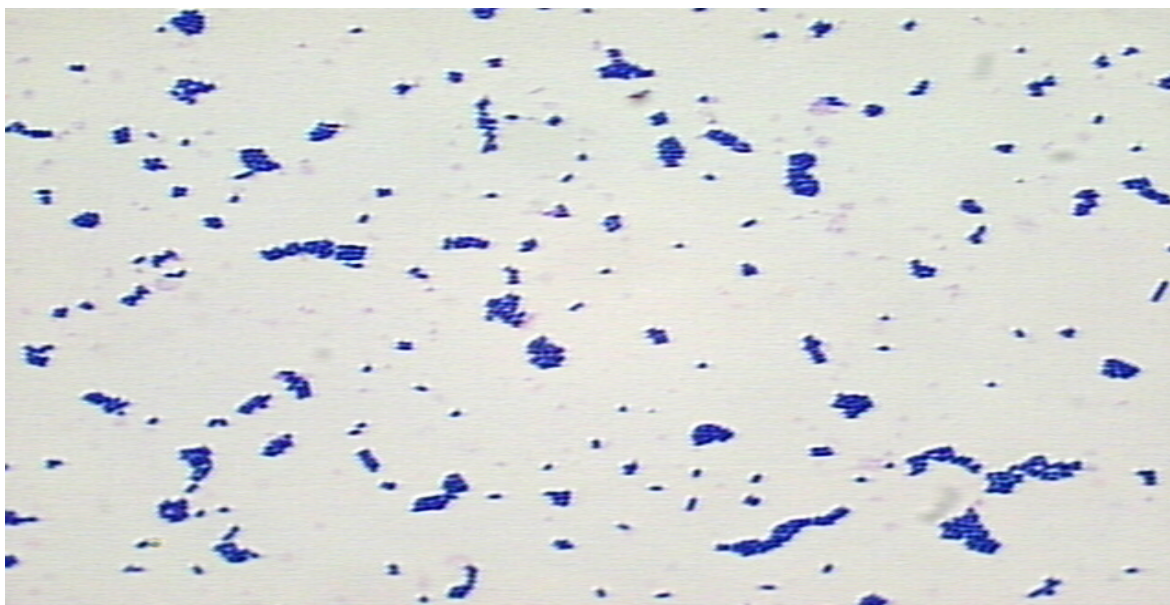


Figura 2. Amostra de *Lactobacillus reuteri*. Coloração de Gram (1000x).

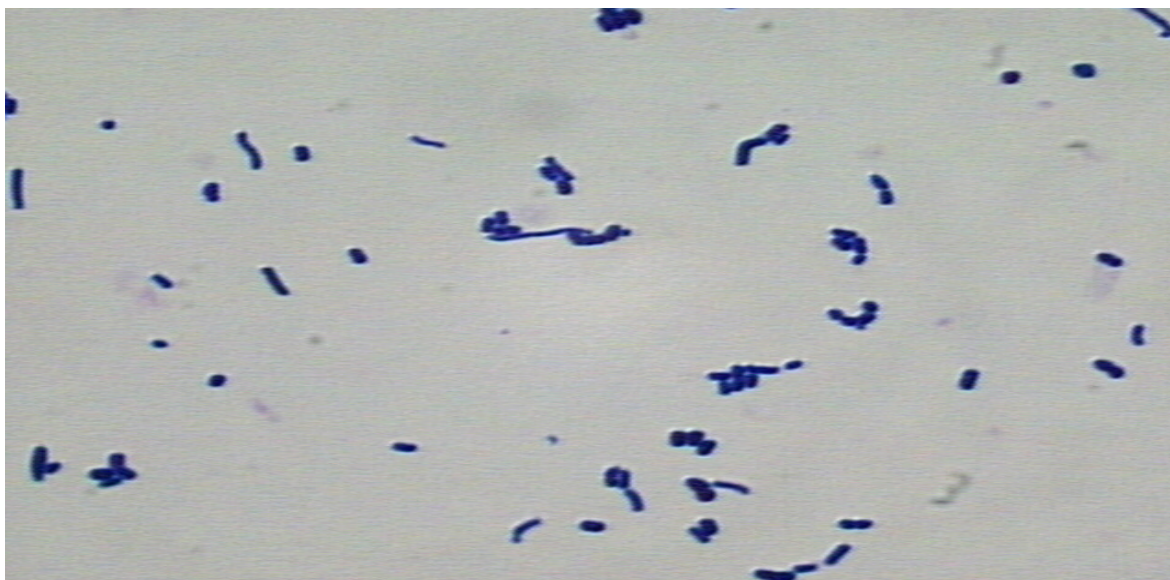


Figura 3. Amostra de *Lactobacillus salivarius*. Coloração de Gram (1000x).

6.2. Bioquímico

A identificação bioquímica das espécies de *Lactobacillus* foi feita utilizando 16 carboidratos. A leitura da fermentação dos carboidratos foi de acordo com as tabelas do manual Bergey's (KANDLER & WEISS,1986) utilizadas para diferenciação de espécies dos grupos obrigatoriamente homo e heterofermentativo.

De acordo com os resultados bioquímicos, as cepas isoladas das aves (AIA), foram identificadas como *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. sp.*, (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Identificação das espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío, através do método bioquímico.

Espécies	QUANTIDADE
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
<i>Lactobacillus fermentum</i>	59
<i>Lactobacillus reuteri</i>	22
<i>Lactobacillus salivarius</i>	21
<i>Lactobacillus spp.</i>	54
Total	180

Tabela 8. Identificação das espécies de *Lactobacillus* isoladas dos cecos, através do método bioquímico.

Espécies	QUANTIDADE
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
<i>Lactobacillus fermentum</i>	66
<i>Lactobacillus reuteri</i>	26
<i>Lactobacillus salivarius</i>	27
<i>Lactobacillus spp.</i>	49
Total	186

6.3. Teste bioquímico API 50 CHL

A identificação das cepas de referência *L. acidophilus* (KCTC), *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* (CCT) e amostras isoladas de aves (AIA) (Tabela 9), foi realizada também, com o uso do kit bioquímico API 50 CHL.

Tabela 9. Identificação das cepas de referência e amostras isoladas de aves (AIA) testadas no API 50 CHL.

Espécies	Origem	Resultado do API 50 CHL
<i>L. acidophilus</i>	CCT 3258	<i>L. coprophilus</i> / <i>L. brevis</i> (98,1%)
<i>L. acidophilus</i>	CCT 3258	<i>L. plantarum</i> / <i>L. pentosus</i> (99,9%)
<i>L. acidophilus</i>	KCTC 3111	<i>L. acidophilus</i> / <i>L. delbrueckii</i> (76,6%)
<i>L. fermentum</i>	CCT 2571	<i>L. fermentum</i> / <i>L. cellobiosus</i> (97,9%)
<i>L. reuteri</i>	CCT 3433	<i>L. fermentum</i> / <i>L. buchneri</i> (92,8%)
<i>L. salivarius</i>	CCT 3752	<i>L. salivarius</i> / <i>L. brevis</i> (99,9%)
<i>L. salivarius</i>	AIA	<i>Pediococcus</i> sp/ <i>L. lactis lactis</i> (93,5%)
<i>L. reuteri</i>	AIA	<i>Brochotermosphacta</i> / <i>L. acidophilus</i>
<i>L. salivarius</i>	AIA	<i>L. pentosus</i> / <i>L. brevis</i> (94,8%)

6.4. PCR

Todas as AIA identificadas através do método bioquímico (fermentação de 16 carboidratos), foram testadas através da PCR com primers (iniciadores) para identificação de *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Amostras isoladas do ingluvívio, identificadas através da PCR.

Espécies	QUANTIDADE
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	104
<i>Lactobacillus salivarius</i>	35
<i>Lactobacillus</i> sp.	41
Total	180

Tabela 11. Amostras isoladas dos cecos, identificadas através da PCR.

Espécie	QUANTIDADE
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	133
<i>Lactobacillus salivarius</i>	17
<i>Lactobacillus</i> sp.	36
Total	186

6.5. Comparação das metodologias empregadas para identificação de *Lactobacillus*

Os resultados obtidos na identificação das espécies de *Lactobacillus* através dos métodos bioquímico e PCR, se encontram explanados na Tabela 12 e figuras 4 e 5 demonstrando a comparação entre os métodos utilizados.

Tabela 12. Valores percentuais (%) de cada espécie de *Lactobacillus*, identificadas através dos métodos bioquímico e PCR.

Espécies	Segmentos			
	INGLÚVIO		CECOS	
	Bioquímico	PCR	Bioquímico	PCR
<i>L. acidophilus</i>	13 a	0 b	10 a	0 b
<i>L. fermentum</i>	33 a	0 b	35 a	0 b
<i>L. reuteri</i>	12 a	58 b	14 a	72 b
<i>L. salivarius</i>	12 a	19 b	15 a	9 a
<i>L. sp.</i>	30 a	23 a	26 a	19 a

Para cada segmento e cada espécie, proporções de métodos seguidas de mesmas letras não diferem significativamente ($P > 0,05$) (teste de McNemar).

Para avaliação entre os segmentos utilizou-se o teste Qui-quadrado, não sendo verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as proporções de cada espécie identificada através do método bioquímico entre os segmentos. Já para proporções de cada espécie através do método PCR verificou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os segmentos para as espécies de *L. reuteri* (58% inglúvio vs 72% cecos) e *L. salivarius* (19% inglúvio vs 9% dos cecos).

A comparação entre o método bioquímico e PCR foi utilizada para identificação de *L. fermentum* e diferenciação entre esta espécie e *L. reuteri*. A proporção de *L. fermentum* do ingluvío e cecos foi negativa quando identificada através da PCR, contudo este foi identificado como *L. reuteri* (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação entre o método bioquímico e PCR, para identificação de *L. fermentum* e diferenciação entre *L. reuteri*, provenientes do ingluvío (I) e cecos (C) de aves.

Segmentos	Espécie analisada	Métodos	Quantidade	Espécies identificadas
I	<i>L. fermentum</i>	Bioquímico	59	59 <i>L. fermentum</i>
		PCR	59	39 <i>L. reuteri</i> 20 <i>L.sp.</i>
C	<i>L. fermentum</i>	Bioquímico	66	66 <i>L. fermentum</i>
		PCR	66	52 <i>L. reuteri</i> 14 <i>L. sp.</i>

P+ = Proporção de positivo.

P+ (*L.fermentum*)= 0

P+ (*L.reuteri*)= 66% (I)

P+ (*L. reuteri*)= 79% (C)

P < 0,01= indica comparação entre P+ (LF) e P+ (LR) em cada segmento.

Figura 4. Amostras isoladas do Inglúvio, identificadas através dos métodos bioquímico e PCR.

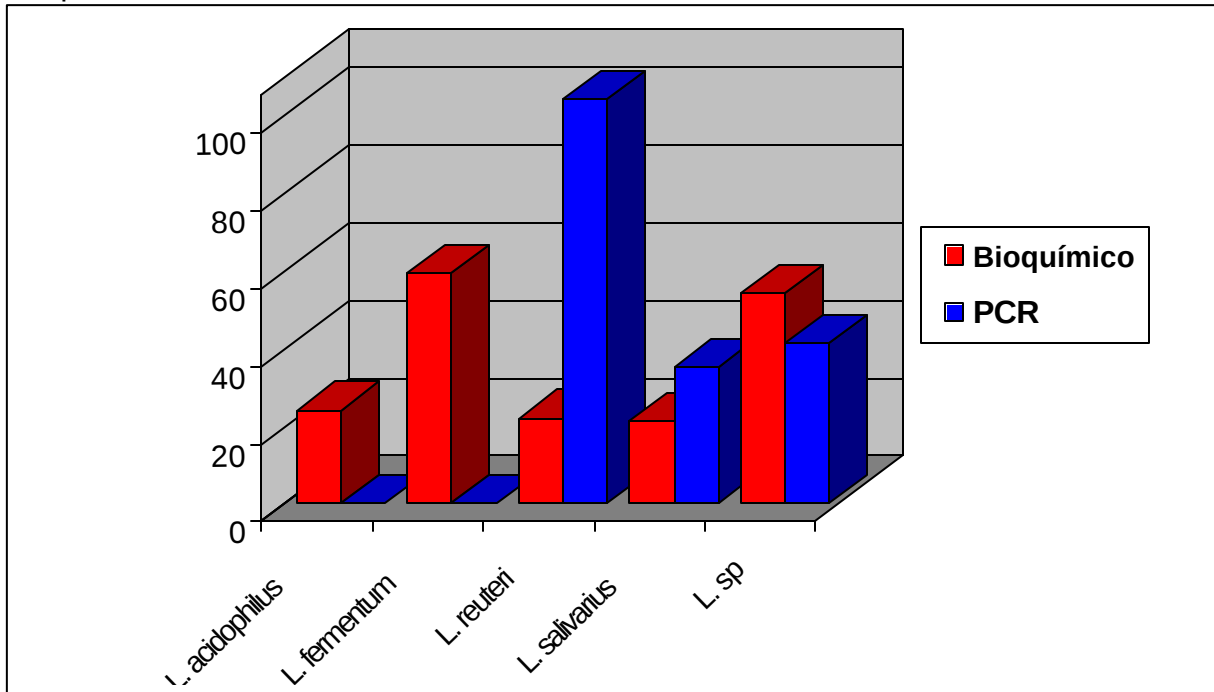
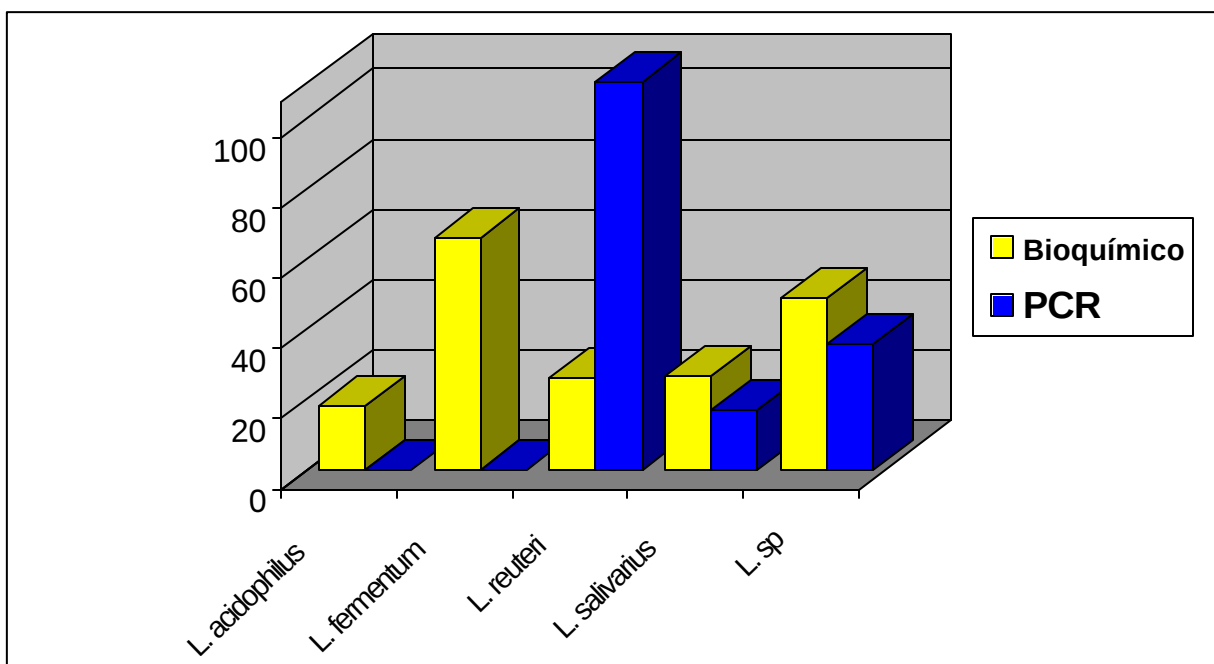


Figura 5. Amostras isoladas dos cecos, identificadas através dos métodos bioquímico e PCR.



L. acidophilus e *L. fermentum* isolados do ingluvío e cecos de aves, foram identificados através do método bioquímico, contudo estas espécies não foram identificadas através da PCR nos respectivos segmentos. A comparação dos métodos para *L. reuteri*, demonstrou um número maior de identificação desta espécie no ingluvío e cecos através da PCR. Já para *L. salivarius* isolado do ingluvío houve diferença entre as metodologias empregadas, e o maior número de isolados esteve presente no ingluvío com identificação através da PCR. A identificação das amostras de *L. sp.* não apresentaram diferença com as duas metodologias utilizadas.

6.6. Eletroforese em gel de agarose dos amplificados de DNA

Os resultados obtidos na identificação das amostras isoladas de aves (AIA) provenientes do ingluvío e cecos através da PCR, encontram-se ilustrados nas Tabelas 14,15,16 e 17.

A tabela 14 refere-se a utilização do multiplex PCR, para identificação das AIA, utilizou-se os primers (iniciadores) para *L. fermentum* (Fer3/ Fer4), *L. reuteri* (Reu1/ Reu2) e *L. salivarius* (Sal1/ Sal2). Os produtos amplificados pela PCR ilustrados na Figura 6, representam a identificação das AIA, com resultados correspondendo a oito amostras de *L. reuteri* e uma amostra negativa.

Tabela 14. Identificação de *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* através do multiplex PCR.

Peso Molecular / DNA	Coluna	Fragmentos esperados	Fragmentos observados
50 pb	1	50 / 50 pb	50 / 50 pb
<i>L. fermentum</i> CCT	2	192	192
<i>L. reuteri</i> CCT	3	303	303
<i>L. salivarius</i> CCT	4	411	411
AIA	5	192, 303 ou 411	303
AIA	6	192, 303 ou 411	303
AIA	7	192, 303 ou 411	303
AIA	8	192, 303 ou 411	303
AIA	9	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	10	192, 303 ou 411	303
AIA	11	192, 303 ou 411	303
AIA	12	192, 303 ou 411	303
AIA	13	192, 303 ou 411	303
Controle Negativo	14	Nenhum	Nenhum

A ilustração do gel de agarose demonstra os produtos amplificados do DNA das cepas de referência e das AIA, realizadas no multiplex PCR.

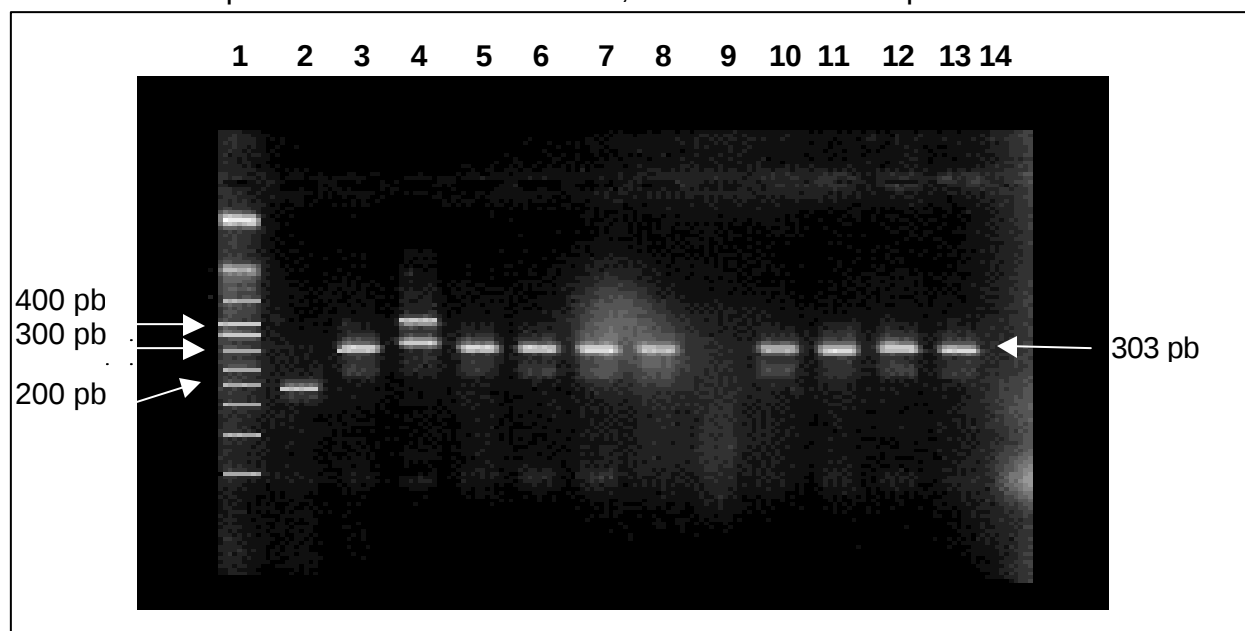


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados no multiplex PCR, com primers para *L. fermentum* (Fer3/ Fer4), *L. reuteri* (Reu1/ Reu2) e *L. salivarius* (Sal1/ Sal2). Marcador de PM 50 pb coluna (1), cepas de referência, amplificados de 192 pb *L. fermentum* (2), 303 pb *L. reuteri* (3) e 411pb *L. salivarius* (4), amplificados das AIA (5,6,7,8,10,11,12 e 13) 303 pb, nenhum amplificado (9) e controle negativo (14).

A Tabela 15 refere-se à utilização do multiplex PCR, para identificação das AIA, utilizou-se os primers (iniciadores) para *L. fermentum* (Fer 3/ Fer4), *L. reuteri* (Reu1/ Reu2) e *L. salivarius* (Sal1/ Sal2). Os produtos amplificados pela PCR, ilustrados na Figura 7 representam a identificação das AIA, com resultados correspondendo a 11 amostras de *L. salivarius* e oito amostras negativas.

Tabela 15. Identificação de *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* através do multiplex PCR.

PM / DNA	Coluna	Fragmentos esperados	Fragmentos observados
100 pb	1	100/ 100 pb	100 / 100 pb
<i>L. fermentum</i> CCT	2	192	192
<i>L. reuteri</i> CCT	3	303	303
<i>L. salivarius</i> CCT	4	411	411
AIA	5	192, 303 ou 411	411
AIA	6	192, 303 ou 411	411
AIA	7	192, 303 ou 411	411
AIA	8	192, 303 ou 411	411
AIA	9	192, 303 ou 411	411
AIA	10	192, 303 ou 411	411
AIA	11	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	12	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	13	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	14	192, 303 ou 411	411
AIA	15	192, 303 ou 411	411
AIA	16	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	17	192, 303 ou 411	411
AIA	18	192, 303 ou 411	411
AIA	19	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	20	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	21	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	22	192, 303 ou 411	Nenhum
AIA	23	192, 303 ou 411	411
Controle Negativo	24	Nenhum	Nenhum

A ilustração do gel de agarose demonstra os produtos amplificados do DNA das cepas de referência e das AIA, realizadas no multiplex PCR.

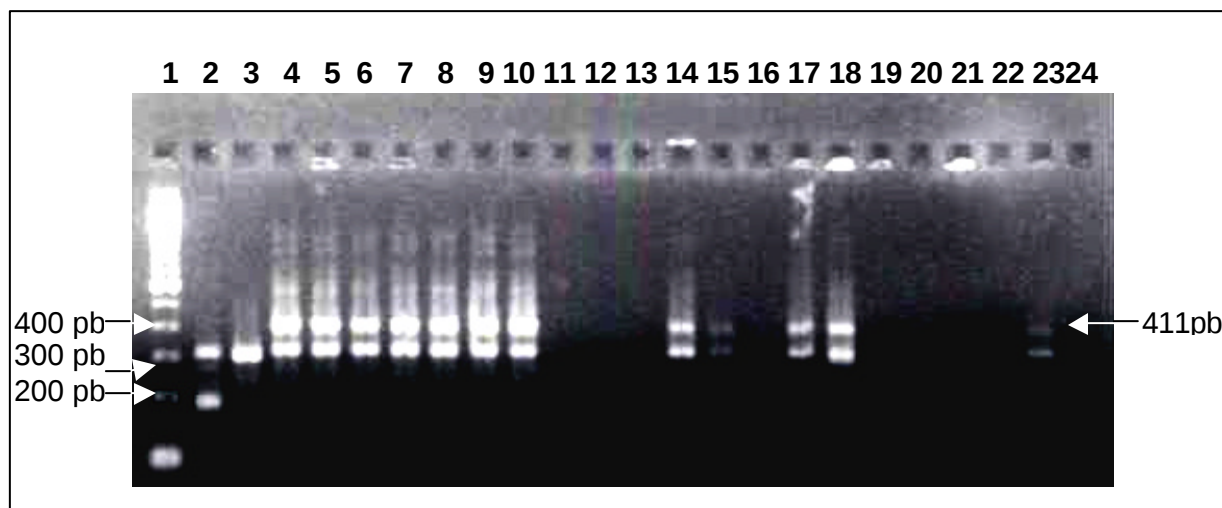


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados no multiplex PCR, com primers para *L. fermentum* (Fer3/ Fer4), *L. reuteri* (Reu1/ Reu2) e *L. salivarius* (Sal1/ Sal2). Marcador de PM 100 pb coluna (1), cepas de referência, amplificados de 192 pb *L. fermentum* (2), 303 pb *L. reuteri* (3) e 411pb *L. salivarius* (4), produtos amplificados das (AIA) (5,6,7,8,9,10,14,15,17,18 e 23) 411pb, nenhum produto amplificado (11,12, 13,16, 19, 20, 21 e 22) e controle negativo (24).

PCR para o grupo *L. acidophilus* e *L. acidophilus*

A Tabela 16 refere-se a utilização da PCR para identificação das AIA, utilizando-se os primers para o grupo *L. acidophilus* (LU-1'/ Lac2), que compreendem *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. helveticus* e *L. jensenii*. E primers (Lac1/ 23-10C) para *L. acidophilus*. Todas as AIA testadas no multiplex PCR, que apresentaram resultado negativo, foram processadas na PCR para o grupo *L. acidophilus*. As Figuras 8 e 9, respectivamente, demonstram o produto amplificado da cepa de referência, das AIA e resultados negativos para o grupo *L. acidophilus* e *L. acidophilus*.

Tabela 16. Identificação do grupo *L. acidophilus* e *L. acidophilus* através da PCR.

Peso Molecular / DNA	Coluna	Fragmentos esperados	Fragmentos observados
100 pb	1	100/ 100 pb	100 / 100 pb
<i>L.acidophilus</i> KCTC	2	300 pb	300 pb
AIA	3	300 pb	Nenhum
AIA	4	300 pb	Nenhum
AIA	5	300 pb	Nenhum
AIA	6	300 pb	Nenhum
AIA	7	300 pb	Nenhum
Controle Negativo	8	Nenhum	Nenhum
100 pb	1	100/ 100 pb	100 / 100 pb
<i>L.acidophilus</i> KCTC	2	210 pb	210 pb
AIA	3	210 pb	Nenhum
AIA	4	210 pb	Nenhum
AIA	5	210 pb	Nenhum
AIA	6	210 pb	Nenhum
AIA	7	210 pb	Nenhum
Controle Negativo	8	Nenhum	Nenhum

A ilustração do gel de agarose demonstra o produto amplificado do DNA da cepa de referência e das AIA, realizadas na PCR.

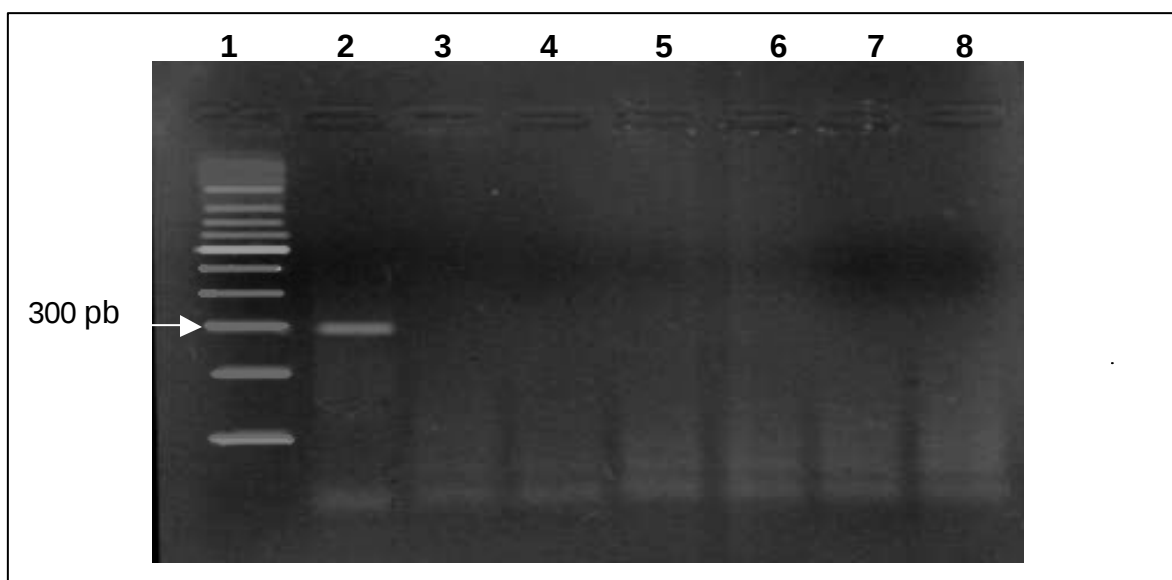


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para análise da PCR, primers para grupo *L. acidophilus* (LU-1'/ Lac2). Marcador de PM 100 pb coluna (1), cepa de referência, produto amplificado de 300 pb para o grupo *L. acidophilus* (2), nenhum produto amplificado das AIA (3,4,5,6 e 7) e controle negativo (8).

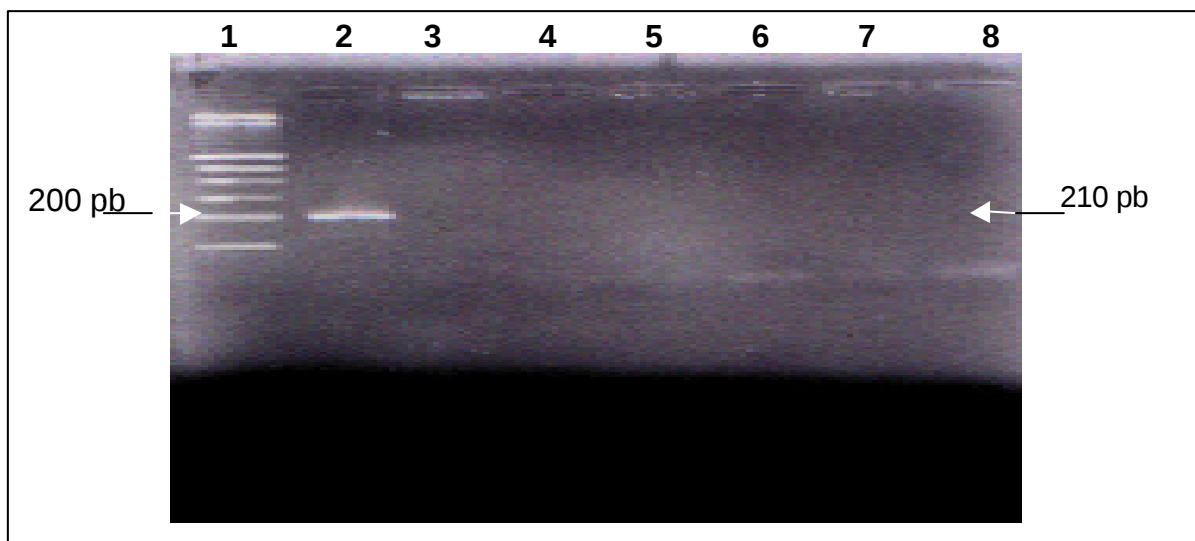


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para análise da PCR, primers para *L. acidophilus* (Lac1/ 23-10C). Marcador de PM 100 pb coluna (1), cepa de referência, produto amplificado de 210 pb para *L. acidophilus* (2), nenhum produto amplificado das AIA (3,4,5,6 e 7) e controle negativo (8).

6.7. Avaliação da inibição *in vitro* das espécies de *Lactobacillus* frente as cepas de *Salmonella*

A diluição decimal para determinação da UFC/ ml das cepas de *Salmonella* foi de 10^7 UFC/ ml, para inibição *in vitro* em todas as espécies de *Lactobacillus* utilizadas.

As Tabelas 17 e 18, referem-se a média de quatro halos (repetibilidade) formados por cada amostra de *L. reuteri* isolada do ingluvío e cecos de aves, frente as cepas de *Salmonella*. Na Tabela 19 consta a avaliação das repetições de *Lactobacillus reuteri* isolados do ingluvío e cecos de aves.

Tabela 17. Médias dos halos de inibição formados por *Lactobacillus reuteri* isolados do ingluvío de aves frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas	Médias dos halos de inibição de cada amostra (cm)*
Enteritidis PT4	1,1; 0,6; 1,2; 0,9; 0,8; 1,1; 0,8; 0,6; 0,9; 0,6; 0,8; 0,6; 1,0; 0,8; 0,5; 1,3
Enteritidis PT 28	1,4; 0,9; 1,6; 0,9; 0,4; 0,6; 0,7; 1,0; 1,2; 0,9; 0,7; 0,6; 1,3; 0,6; 0,6; 1,3
Typhimurium	1,4; 0,6; 1,1; 0,6; 0,4; 0,5; 0,7; 0,5; 1,2; 0,6; 0,5; 0,5; 1,1; 0,7; 0,8; 1,6
Pullorum	1,0; 1,0; 1,7; 1,1; 1,3; 0,4; 0,9; 1,1; 1,2; 1,1; 0,7; 1,5; 1,4; 0,6; 0,7; 1,2
Agona	1,0; 0,5; 1,3; 0,6; 0,3; 0,9; 1,4; 1,0; 1,1; 1,0; 0,5; 1,3; 1,1; 0,5; 1,3; 1,7
Anatum	1,5; 0,8; 0,3; 0,8; 0,7; 1,2; 0,0; 0,8; 0,9; 1,3; 0,8; 0,8; 1,7; 1,0; 1,0; 1,7
Dublin	0,7; 0,7; 1,5; 0,7; 0,6; 2,1; 0,0; 0,9; 1,4; 0,6; 0,6; 0,5; 1,6; 0,0; 0,3; 0,7
Senftenberg	1,4; 0,6; 1,0; 0,5; 0,5; 1,1; 1,0; 0,6; 1,0; 0,8; 1,0; 1,5; 1,9; 0,4; 0,6; 1,4

*Média de quatro repetibilidade.

Tabela 18. Médias dos halos de inibição formados por *Lactobacillus reuteri* isolados dos cecos de aves frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas	Médias dos halos de inibição de cada amostra (cm)*
Enteritidis PT4	1,4; 1,2; 0,8; 0,5; 0,8; 1,4; 0,7; 0,0; 0,8; 0,7; 1,1; 0,8; 0,5; 0,7; 0,7; 1,0
Enteritidis PT 28	1,6; 0,9; 1,1; 0,0; 0,9; 1,1; 1,1; 1,6; 1,0; 0,8; 0,9; 0,8; 0,4; 1,7; 0,8; 0,9
Typhimurium	1,1; 1,2; 0,9; 0,5; 0,5; 1,3; 0,8; 0,7; 1,2; 0,8; 1,1; 0,9; 0,5; 1,6; 0,7; 0,6
Pullorum	0,9; 1,0; 1,3; 0,5; 1,0; 0,9; 0,6; 1,5; 1,5; 1,1; 1,5; 1,0; 1,4; 1,3; 0,6; 1,4
Agona	1,2; 0,8; 1,1; 1,2; 0,5; 1,1; 0,8; 1,4; 1,0; 0,8; 1,0; 0,8; 0,8; 1,6; 1,6; 1,3
Anatum	0,8; 1,3; 1,2; 0,7; 0,9; 0,6; 0,6; 1,2; 0,0; 0,7; 0,0; 0,8; 0,7; 0,6; 0,0; 0,0
Dublin	1,2; 0,0; 0,9; 0,5; 0,9; 0,9; 0,6; 1,1; 0,0; 1,0; 1,7; 1,1; 1,2; 0,8; 0,0; 0,5
Senftenberg	1,3; 1,0; 1,1; 0,0; 0,5; 0,5; 1,0; 0,9; 1,5; 1,6; 0,4; 0,7; 0,7; 1,5; 0,0; 1,2

*Média de quatro repetibilidade.

Tabela 19. Médias das repetições dos halos (cm) de inibição formados por *Lactobacillus reuteri* provenientes do ingluvío (**I**) e cecos (**C**) frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>								
	Enteritidis PT4	Enteritidis PT28	Typhimurium	Pullorum	Agona	Anatum	Dublin	Senftenberg
I	0,85Aa	0,92Aa	1,05Aa	0,80Aa	0,96Aa	0,95Aa	0,86Aa	0,96Aa
C	0,79ABa	0,98ABa	1,08Aa	0,89Aba	1,07Aa	0,63Bb	0,76ABa	0,87ABa

Letras maiúsculas: Comparam médias das cepas de *Salmonella* para cada segmento.

Letra minúsculas: Comparam médias de segmentos para cada cepa de *Salmonella*.

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual, não diferem significativamente ($P > 0.05$).

Os resultados das médias para *L. reuteri* isolados do ingluvío não apresentaram diferença significativa entre as cepas de *Salmonella*. Já entre os isolados dos cecos, houve diferença significativa das médias referentes as cepas de *S. Typhimurium* e *S. Agona* em relação a *S. Anatum*. Enquanto que a média de *S. Anatum* apresentou diferença significativa entre os isolados do ingluvío e cecos.

As Tabelas 20 e 21, referem-se a média da repetibilidade dos halos formados por cada amostra de *L. salivarius* isolada do ingluvío e cecos de aves, frente as cepas de *Salmonella*. Na Tabela 22 consta a avaliação das repetições de *Lactobacillus reuteri* isolados do ingluvío e cecos de aves.

Tabela 20. Médias dos halos de inibição formados por *Lactobacillus salivarius* isolados do ingluvío de aves frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas	Médias dos halos de inibição de cada amostra (cm)*
Enteritidis PT4	0,7; 0,8; 0,7; 0,9; 0,8; 0,6; 0,8; 0,5; 0,5; 0,5; 0,7; 1,1; 0,6; 0,0; 1,0
Enteritidis PT 28	0,6; 1,7; 1,0; 1,0; 0,9; 0,6; 1,5; 0,4; 0,6; 0,5; 0,4; 0,6; 1,0; 0,7; 0,7
Typhimurium	0,8; 1,1; 0,9; 1,0; 0,9; 0,6; 1,8; 0,5; 0,4; 0,6; 0,3; 0,6; 0,8; 0,7; 1,1
Pullorum	1,2; 1,0; 0,8; 0,7; 0,9; 0,7; 1,5; 0,7; 0,8; 0,5; 0,4; 0,8; 1,1; 0,6; 0,8
Agona	0,9; 1,7; 0,8; 1,0; 1,0; 1,2; 1,4; 1,1; 1,5; 1,4; 0,8; 0,6; 1,0; 0,7; 1,7
Anatum	0,8; 0,4; 0,9; 1,5; 1,4; 0,6; 1,4; 0,6; 1,5; 1,2; 0,0; 1,2; 0,7; 0,0; 0,8
Dublin	0,4; 0,7; 0,6; 0,6; 1,0; 0,7; 0,0; 0,7; 1,1; 0,0; 0,0; 0,0; 0,8; 0,9; 0,0
Senftenberg	0,8; 0,3; 1,0; 0,8; 1,7; 0,8; 1,8; 0,8; 0,7; 0,4; 0,5; 1,3; 1,3; 0,8; 0,7

* Média de quatro repetibilidade.

Tabela 21. Médias dos halos de inibição formados por *Lactobacillus salivarius* isolados dos cecos de aves frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas	Médias dos halos de inibição de cada amostra (cm)*
Enteritidis PT4	0,8; 0,9; 0,9; 1,2; 1,0; 1,5; 0,9; 1,4; 0,6; 0,5; 0,9; 1,2; 0,9; 1,0; 0,6
Enteritidis PT 28	0,9; 0,7; 0,9; 1,6; 1,6; 1,9; 0,8; 1,5; 0,7; 1,1; 1,3; 0,7; 0,6; 1,0; 0,4
Typhimurium	0,7; 0,6; 1,0; 0,4; 0,5; 0,8; 1,3; 1,5; 0,9; 1,1; 0,5; 0,8; 0,9; 0,5; 1,1
Pullorum	0,7; 0,6; 1,0; 1,3; 0,8; 1,3; 0,9; 1,6; 0,9; 1,4; 0,6; 0,7; 0,9; 0,5; 0,9
Agona	0,6; 1,2; 0,8; 0,5; 1,7; 1,7; 0,5; 1,3; 0,8; 0,9; 1,5; 0,8; 0,7; 1,5; 0,9
Anatum	0,8; 0,5; 1,2; 0,0; 0,7; 0,0; 0,0; 0,9; 0,7; 1,3; 1,0; 0,7; 0,0; 0,0; 0,6
Dublin	0,0; 0,5; 1,1; 1,1; 1,1; 0,0; 1,7; 1,8; 0,9; 0,0; 0,0; 0,0; 0,5; 0,0; 0,5
Senftenberg	0,8; 0,7; 1,0; 1,7; 1,3; 1,5; 1,5; 1,4; 1,1; 1,5; 1,3; 1,0; 0,4; 0,0; 1,2

* Média de quatro repetibilidade.

Tabela 22. Médias das repetições dos halos (cm) de inibição formados por *Lactobacillus salivarius* provenientes do inglúvio (**I**) e cecos (**C**) frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>								
	Enteritidis PT4	Enteritidis PT28	Typhimurium	Pullorum	Agona	Anatum	Dublin	Senftenberg
I	0,74ABa	0,80ABa	0,84ABa	0,80ABa	1,10Aa	0,86ABa	0,50Ba	0,90Aa
C	0,94ABb	1,04ACb	0,92ABa	0,84ABa	1,02ACa	0,55Ba	0,60BCa	1,07Aa

Letras maiúsculas: Comparam médias das cepas de *Salmonella* para cada segmento.

Letra minúsculas: Comparam médias de segmentos para cada cepa de *Salmonella*.

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual, não diferem significativamente ($P > 0.05$).

Os resultados das médias para *L. salivarius* isolados do inglúvio apresentaram diferença significativa referente as médias das cepas de *S. Agona* e *S. Senftenberg* em relação a *S. Dublin*. Enquanto que as médias dos isolados dos cecos referentes as cepas de *S. Enteritidis PT28*, *S. Agona* e *S. Senftenberg* em relação a *S. Anatum* demonstraram diferença significativa.

As médias entre os isolados do inglúvio e cecos apresentaram diferença significativa em relação as cepas de *S. Enteritidis PT4* e *S. Enteritidis PT28*.

As Tabelas 23 e 24, referem-se a média individual da repetibilidade dos halos formados por cada amostra de *Lactobacillus* sp. isolada do ingluvío e cecos de aves, frente a cepas de *Salmonella*. Na Tabela 25 consta a avaliação das repetições de *Lactobacillus reuteri* isolados do ingluvío e cecos de aves.

Tabela 23. Médias dos halos de inibição formados por *Lactobacillus* sp. isolados do ingluvío de aves frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas	Médias dos halos de inibição de cada amostra (cm)*
Enteritidis PT4	1,1; 0,8; 1,2; 0,7; 0,4; 0,8; 0,5; 1,0; 0,9; 0,6; 0,9; 0,5; 1,0; 0,9; 0,8
Enteritidis PT 28	1,0; 0,6; 1,0; 0,6; 0,7; 0,8; 0,6; 0,0; 1,1; 1,2; 0,9; 0,6; 0,7; 0,5; 0,7
Typhimurium	0,8; 0,7; 0,7; 0,4; 0,5; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 0,6; 0,8; 0,0; 0,9; 0,0
Pullorum	0,6; 1,0; 0,0; 0,0; 0,7; 1,0; 1,4; 0,8; 1,1; 1,5; 1,1; 1,0; 0,7; 0,7; 1,0
Agona	1,5; 1,1; 1,0; 0,0; 0,7; 1,2; 0,5; 0,8; 1,4; 0,9; 1,2; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0
Anatum	0,0; 0,4; 0,0; 0,9; 0,0; 0,0; 1,0; 0,0; 0,8; 1,4; 0,7; 0,9; 0,7; 0,8; 1,2
Dublin	0,0; 1,0; 0,0; 0,6; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 0,9; 0,6; 0,8; 0,7
Senftenberg	1,0; 0,7; 0,8; 0,8; 0,6; 0,9; 0,9; 0,7; 0,9; 1,6; 1,0; 0,7; 0,7; 1,1; 0,8

* Média de quatro repetibilidade.

Tabela 24. Médias dos halos de inibição formados por *Lactobacillus* sp. isolados dos cecos de aves frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas	Médias dos halos de inibição de cada amostra (cm)*
Enteritidis PT4	0,8; 0,8; 0,7; 0,7; 0,7; 0,8; 0,7; 0,7; 0,9; 1,3; 0,5; 1,1; 0,8; 1,1; 1,1; 1,0
Enteritidis PT 28	1,2; 1,1; 1,4; 0,8; 0,8; 1,1; 0,6; 1,5; 1,4; 1,4; 0,8; 0,3; 0,9; 0,6; 0,8; 0,0
Typhimurium	0,6; 1,2; 1,2; 0,5; 0,9; 0,8; 0,9; 1,6; 1,5; 1,9; 0,5; 0,6; 1,2; 0,0; 0,7; 0,0
Pullorum	0,6; 1,3; 1,3; 1,1; 0,9; 0,9; 0,8; 1,8; 1,6; 1,4; 0,4; 0,7; 0,7; 0,0; 0,8; 1,0
Agona	1,0; 1,3; 1,2; 0,8; 1,5; 1,4; 1,0; 1,0; 1,5; 1,6; 0,0; 0,0; 0,0; 1,1; 0,9; 1,1
Anatum	0,0; 1,2; 0,8; 0,7; 0,9; 1,5; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 0,8; 0,8; 1,0; 0,6; 0,0; 0,4
Dublin	0,9; 0,0; 0,0; 0,8; 0,9; 0,0; 0,9; 1,3; 1,0; 1,0; 0,9; 0,8; 0,8; 0,6; 0,6; 1,2
Senftenberg	0,8; 1,2; 1,0; 0,7; 1,3; 1,6; 0,6; 1,7; 0,7; 1,4; 0,9; 0,0; 1,0; 0,8; 1,2; 1,0

*Média de quatro repetibilidade.

Tabela 25. Médias das repetições dos halos (cm) de inibição formados por *Lactobacillus* sp. provenientes do ingluvío (**I**) e cecos (**C**) frente as cepas de *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>								
	Enteritidis PT4	Enteritidis PT28	Typhimurium	Pullorum	Agona	Anatum	Dublin	Senftenberg
I	0,82Aa	0,76Aa	0,85Aa	0,65ABa	0,73Aa	0,64ABa	0,32Ba	0,89Aa
C	0,84ABa	0,90ABa	0,96Aa	0,88ABa	0,95Aa	0,53Ba	0,73ABb	0,98Aa

Letras maiúsculas: Comparam médias das cepas de *Salmonella* para cada segmento.

Letra minúsculas: Comparam médias de segmentos para cada cepa de *Salmonella*.

Médias seguidas de pelo menos uma letra igual, não diferem significativamente ($P > 0.05$).

Os resultados para *Lactobacillus* sp. isolados do ingluvío, demonstraram que em relação a *S. Dublin* houve diferença significativa entre as médias referentes as cepas de *S. Enteritidis* PT4, *S. Enteritidis* PT28, *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Senftenberg*. Já para os isolados dos cecos houve diferença significativa entre as médias referentes as cepas de *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Senftenberg* em relação a *S. Anatum*. As médias entre os isolados do ingluvío e cecos apresentaram diferença significativa em relação a *S. Dublin*.

As Figuras 10, 11, 12 e 13, demonstram a formação de halos na inibição *in vitro* por várias espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío e cecos frente as cepas de *Salmonella*.

Figura 10. Halo de inibição formado por *Lactobacillus reuteri* frente a *Salmonella Pullorum*.

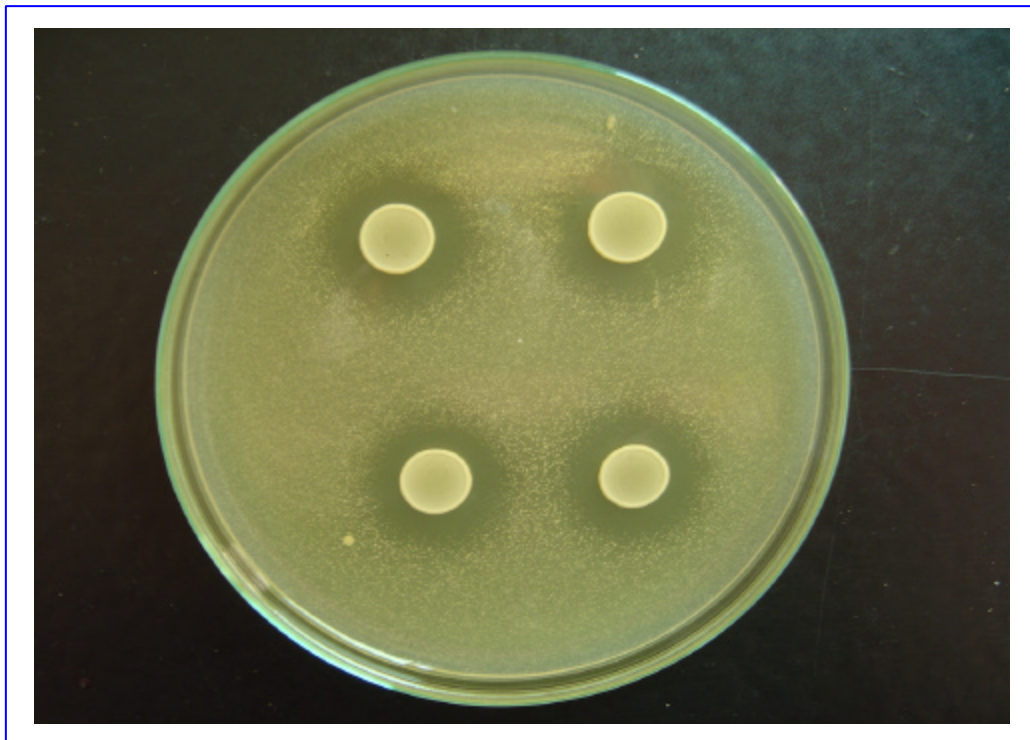


Figura 11. Halo de inibição formado por *Lactobacillus salivarius* frente a *Salmonella Enteritidis* PT4.

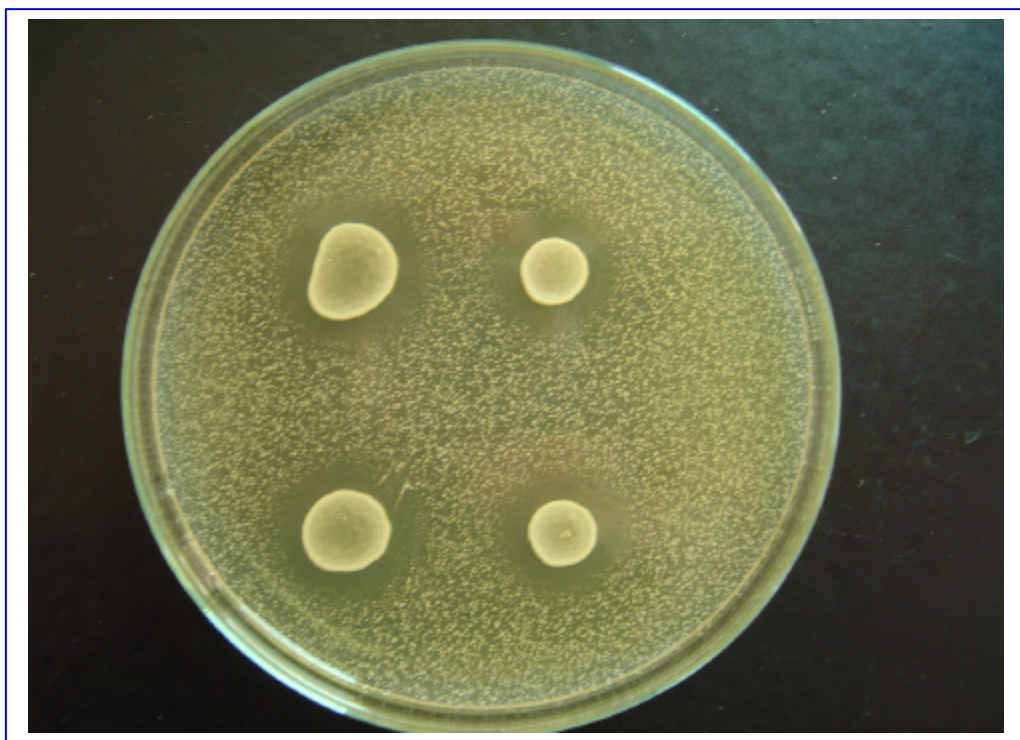


Figura 12. Halo de inibição formado por *Lactobacillus salivarius* frente a *Salmonella* Typhimurium.

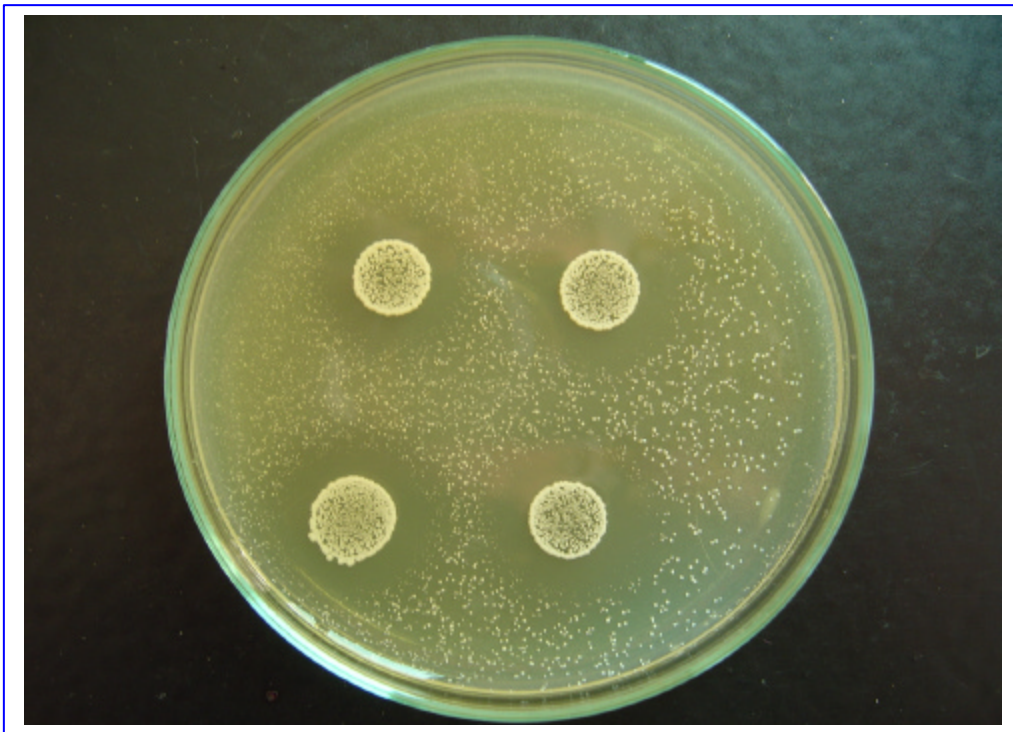
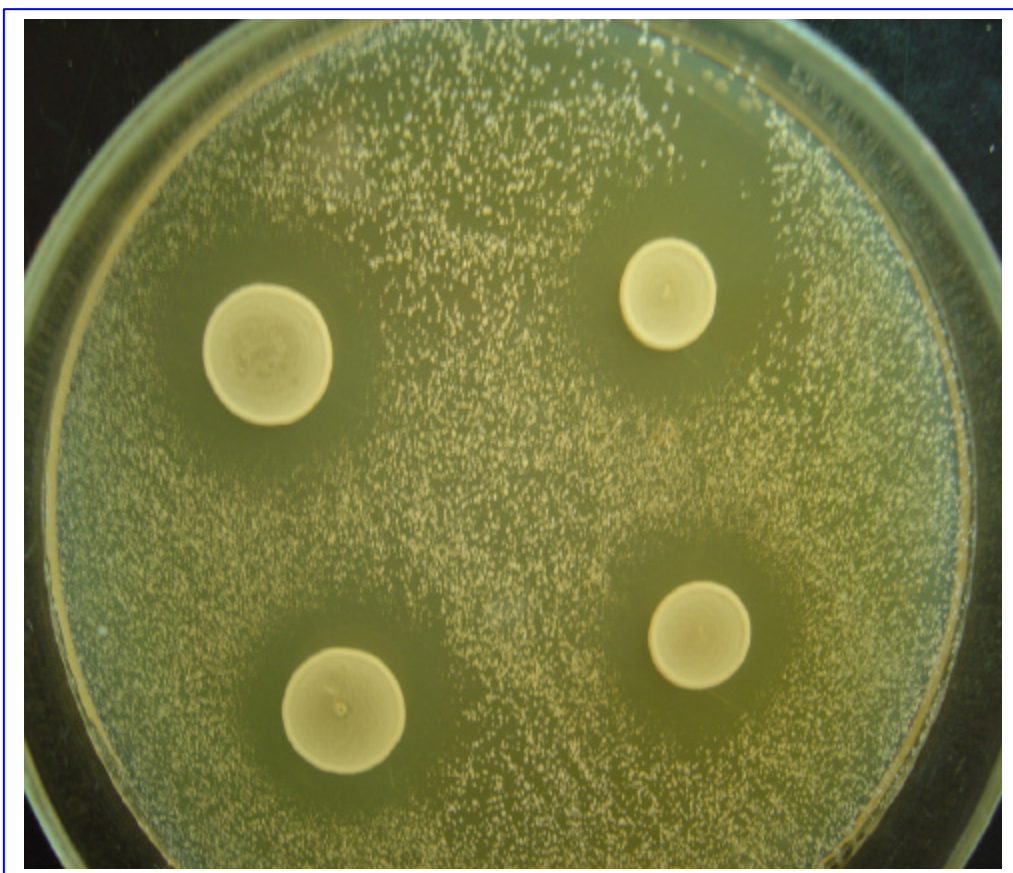


Figura 13. Halo de inibição formado por *Lactobacillus* sp frente a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 28.



7. DISCUSSÃO

A administração de microrganismos da microbiota intestinal de aves pode determinar alguma proteção às aves contra a colonização por alguns patógenos, como *Salmonella* spp. (NURMI & RANTALA, 1973; SCHNEITZ , 1992; ZIPRIN *et al.*, 1993; CORRIER *et al.*, 1995; ANDREATTI FILHO *et al.*, 1997, 1998), *Escherichia coli* (GILLILAND & SPECK, 1977; JIN *et al.*, 1996) e *Campylobacter* spp. (BAILEY, 1993), sendo extremamente importante o estudo da microbiota de aves, bem como a ação antimicrobiana produzida por bactérias como *Lactobacillus* spp. (COCCONCELLI, 1993). De acordo com FULLER (1973), os *Lactobacillus* possuem funções benéficas que podem suprimir bactérias patogênicas indesejáveis no intestino.

Se considera importante identificar as espécies de *Lactobacillus* spp. presentes no ecossistema microbiano e determinar quais apresentam efeito protetor (SONG *et al.*, 2000).

7.1 Isolamento de *Lactobacillus*

Experimentos *in vivo* têm sido realizado para demonstrar o papel benéfico das bactéria ácido lácticas (LAB) incluindo os *Lactobacillus* na saúde de humanos e animais, mas são necessários métodos eficientes e simples para detectar e identificar as mesmas (CHAGNAUD *et al.*, 2001). O isolamento e identificação consiste na utilização de meios de cultura e temperaturas de incubação específicos. Segundo KANDLER E WEISS (1986) a utilização de meio

seletivo como ágar DeMan Rogosa Sharpe (MRS) é um dos pré-requisitos para isolamento de bactérias como *Lactobacillus*. No presente trabalho os meios utilizados foram caldo e ágar MRS.

A temperatura de incubação a 45 °C é referenciada por KANDLER e WEISS (1986) como satisfatória para o isolamento de *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, mas não para *L. acidophilus*, enquanto que KLEIN *et al.* (1998) observaram que a mesma é ideal para o crescimento desta espécie e BUCHANAN *et al.* (1974) consideraram como temperaturas ótimas de 35 a 38°C.

CHAVES *et al.* (1999) obtiveram isolamento de *L. acidophilus* de fezes de vacas utilizando a temperatura de incubação à 37°C por 48 horas, em condições de microaerofilia. Segundo COLLINS e HARTLEIN (1982) para o isolamento de *L. acidophilus* as temperaturas mínimas indicadas são 15 a 22°C e máximas 45 a 48°C. Contudo, o isolamento da cepa *L. acidophilus* (ATCC 11506) apresentou crescimento a 32°C segundo MICOLAJCIK e HAMDAN (1975).

Neste trabalho utilizou-se temperatura de incubação a 37°C durante 24 a 48 horas em anaerobiose, obtendo-se só o isolamento de *L. reuteri*, mas quando incubou-se a 37 e 45°C durante 12 a 18 horas em anaerobiose, isolou-se *L. salivarius*.

MIYAMOTO *et al.* (2000) isolaram da cloaca *L. fermentum* e também desta e muco vaginal de galinhas, *L. acidophilus* e *L. salivarius*, após incubação em ágar seletivo a 37°C durante 72 horas em anaerobiose, a identificação foi realizada através do sistema API 50 CHL.

REQUE *et al.* (2000) utilizaram temperatura de 37°C durante 48

horas em anaerobiose para isolamento de *Lactobacillus* provenientes do ingluvío, proventrículo, moela, íleo e cecos de aves. Obtiveram como resultado o isolamento de *L. fermentum* dos cecos.

De acordo com KLAENHAMMER *et al.* (1995), as espécies de maior incidência no intestino de humanos, suínos e galinhas são *L. salivarius* e *L. reuteri*, sendo esta última presente também no intestino de vaca, cachorro, gato, camundongo e rato. Segundo GARRIGA *et al.* (1998) *L. salivarius* é a espécie predominante no ingluvío e conteúdo intestinal de galinhas jovens, enquanto *L. reuteri* é espécie heterofermentativa dominante no intestino de vacas (SARRA *et al.*, 1979).

7.2. Testes fisiológicos, bioquímicos e API 50 CHL

A caracterização fenotípica do gênero *Lactobacillus* se dá através de testes catalase (SHARPE, 1981), produção de gás em glicose (COLLINS & HARTLEIN, 1982), produção de H₂S em TSI (SNEATH *et al.*, 1986) e a morfologia através da coloração pelo método de Gram (PELCZAR *et al.*, 1981). Neste estudo, inicialmente utilizou-se os testes acima para a caracterização das amostras como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Para a identificação das espécies foi utilizado a fermentação de carboidratos, resultando na identificação de *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, mas a interpretação da fermentação de alguns carboidratos demonstrou ser subjetiva, concordando com MORISHITA & SHIROMIZU (1986) que também relataram dificuldades para identificação de bactérias ácido lácticas somente com base no padrão de

fermentação de carboidratos. Segundo (KANDLER e WEISS, 1986; NOUR, 1998) o gênero *Lactobacillus* é composto por mais de 60 espécies, sendo que a identificação baseada em critérios fisiológicos e bioquímicos é ambígua e complicada. HAMMES & VOGEL (1995) consideraram difícil, porque há grande número de espécies de *Lactobacillus* e são exigidos vários testes de fermentação de carboidratos para identificação.

Outro método utilizado para identificação de *Lactobacillus*, é o teste API 50 CHL composto por 49 carboidratos para identificação de espécies de *Lactobacillus*. No presente estudo utilizou-se também o API 50 CHL para identificação de algumas amostras, embora este tenha suscitado algumas dúvidas em relação aos seus resultados, uma vez que houve discrepância entre amostras de referência *L. reuteri* (CCT) ser identificada como *L. fermentum* com (92,8%) de confiabilidade, a espécie de *L. reuteri* não consta na base de dados da Biomérieux. Concordando com CHAGNAUD *et al.* (2001) que obtiveram resultado semelhante com a utilização do API 50 CHL para identificação de *L. reuteri*, sendo considerada como *L. fermentum* com (96,9%) de confiabilidade. De MARTINIS (2001) considerou insatisfatória a utilização do padrão de fermentação de carboidratos como único critério para identificação das LAB, por que ocorre freqüentemente variações nas fermentações e a interpretação pode ser subjetiva.

MOLIN *et al.* (1992) utilizando o API 50 CHL para identificação de *Lactobacillus* na mucosa intestinal de ratos, não obtiveram sucesso na diferenciação entre as espécies de *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus* e *L. jensenii*, corroborando com BORCH & MOLIN (1998) que demonstraram ser

duvidosa a identificação de *Lactobacillus* pela sua habilidade na fermentação de carboidratos.

7.3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Devido as dificuldades encontradas para se caracterizar o gênero *Lactobacillus*, o desenvolvimento de métodos baseados na PCR tem aberto novas possibilidades para identificação precisa e rápida das LAB (TORRIANE *et al.*, 1999), sendo encontrada em crescente aplicação na microbiologia de alimentos (DRAKE *et al.*, 1996).

No presente estudo a PCR foi uma ferramenta utilizada para auxiliar na identificação das espécies de *Lactobacillus*, cujos resultados apresentaram-se discrepantes quando comparados com a fermentação de carboidratos. De acordo com CHAGNAUD *et al.* (2001), que utilizaram o padrão de fermentação de carboidratos e a PCR, esta mostrou-se mais discriminativa do que a fermentação de carboidratos, tendo como comparativo a utilização das cepas de referência para identificação das espécies utilizadas nos métodos acima citados.

Os primers (iniciadores) utilizados neste trabalho para identificação dos *Lactobacillus* foram espécie-específicos, com base na seqüência do RNA ribossomal (rRNA) da região do espaço intergênico (ISR) do 16S e 23S, concordando com STILES *et al.* (1997) que reportaram o progresso das técnicas para estudos da relação fenotípica, baseadas nas análises de seqüências do rRNA do 16S e 23S, pois a informação genética dessas moléculas é altamente conservada e apropriada para determinar a relação das bactérias.

Segundo IKUTA (1999) as técnicas da biologia molecular utilizadas para diagnóstico, são baseadas no princípio de hibridação e replicação de ácidos nucléicos. Sondas de hibridação e iniciadores da PCR que detectam a região do 16S ou 23S do rRNA têm sido aplicados com sucesso na identificação e detecção de algumas espécies de *Lactobacillus* (HERTEL *et al.*, 1991; DIMICHELE & LEWIS 1993).

No presente estudo, a PCR foi utilizada com primers (iniciadores) espécie-específicos para as cepas de referência e amostras isoladas do ingluvío e cecos de aves, para identificação de *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, e grupo *L. acidophilus* que compreende as espécies de *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. jensenii*. Os resultados obtidos através da PCR para identificação das AIA, foram *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L.sp.*, não sendo identificado *L. acidophilus* e *L. fermentum*.

SONG *et al.* (2000) utilizaram estes mesmos iniciadores e método para identificação das espécies acima como cepas de referência e amostras isoladas do intestino de humanos, tendo como resultado a identificação de várias LAB, que incluíram *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*. De acordo com SCHLEIFER & LUDWIG (1995) usando seqüências do DNA ribossomal (rDNA) do 16S, os *Lactobacillus* tem sido classificados em cinco grupos filogenéticos: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri* e *L. plantarum*.

Há dificuldades na distinção entre *L. reuteri* e *L. fermentum* através dos testes fisiológicos convencionais e métodos bioquímicos (REUER, 1997), mesmo eles não sendo relacionados geneticamente, como indicado pela sua

diferença no mol% de G+C do DNA (KANDLER e WEISS, 1986). Essa diferença pôde ser observada pelos resultados obtidos no presente trabalho, com a distinção do *L. fermentum* e *L. reuteri* através da PCR. Das amostras isoladas do inglúvio e cecos de aveas, e identificadas através do método bioquímico como *L. fermentum*, nenhuma foi positiva através da PCR, contudo estas amostras foram identificadas como *L. reuteri* em 66% dos isolados do inglúvio e 79% dos isolados dos cecos. LERCHE e REUTER (1962) isolaram *L. fermentum* e consideraram ser espécie dominante no intestino, sendo a mesma considerada como referência. Mas KANDLER e WEISS (1986) através da homologia DNA-DNA descreveram este biotipo acima como uma nova espécie de *Lactobacillus* heterofermentativo, identificada como *L. reuteri*. KLEIN *et al.* (1998) consideraram a característica molecular como ferramenta utilizada para diferenciar estas duas espécies.

MITSUOKA *et al.* (1992) relataram que até 1980 os pesquisadores classificaram *L. acidophilus* com base nas reações morfológicas e fenotípicas. Segundo LAUER *et al.* (1980) o grupo *L. acidophilus* é completamente heterogêneo e é composto por seis espécies distintas incluindo *L. acidophilus* (novo tipo ATCC 4356), *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* e *L. johnsonii*, com avaliação baseada na homologia de DNA e consideraram que *L. acidophilus* não seja predominante no intestino de humanos, animais e roedores. KLAENHAMMER *et al.* (1995) relataram que em aves há *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, identificadas através da homologia DNA-DNA.

7.4. Ação inibitória *in vitro* de *Lactobacillus* frente a patógenos

Os mecanismos que os *Lactobacillus* utilizam para inibir o crescimento de outras bactérias *in vitro*, estão relacionados com a produção de peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos como os ácidos láctico e acético para redução do pH e a produção de proteínas específicas como as bacteriocinas (HINTON *et al.*, 1992; CHATEAU *et al.*, 1993).

Neste trabalho, observou-se a ação de *Lactobacillus* isolados do ingluvío e cecos de aves em relação a cepas de *Salmonella*, mensurada através dos halos de inibição. As espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío e cecos de aves inibiram *S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*. Utilizamos a técnica spot-on-the-lawn para avaliação da atividade inibitória *in vitro* dos *Lactobacillus* frente a *Salmonella*. COSBY *et al.* (1997) que avaliaram isolados bacterianos incluindo os *Lactobacillus* provenientes da moela e cecos de galinhas para atividade inibitória *In vitro* contra *Salmonella Typhimurium*. Dentre os vários métodos de inibição utilizaram o spot-on-the-lawn e verificaram que este é capaz de oferecer reprodutibilidade rápida e resultados confiáveis, observando a inibição pela presença de halos.

No presente trabalho a repetibilidade dos quatro halos apresentaram uma maior e menor média individual para cada espécie em relação aos isolados do ingluvío e cecos, respectivamente para *L. reuteri* 1,3 e 0,5cm e 1,4 e 0,2cm; *L. sp* 1,2 e 0,4cm e 1,3 e 0,5cm e *L. salivarius* 1,1 e 0,5cm e 1,5 e 0,5 cm. As

médias das repetições de *L. salivarius* entre os isolados do ingluvío e cecos apresentaram diferença significativa em relação aos sorotipos Enteritidis fagotipo 4 e Enteritidis fagotipo 28. MIYAMOTO *et al.* (2000) observaram que os isolados de cloaca e vagina, respectivamente apresentaram para *L. salivarius* 1,2 e 0,7cm e 1,1 e 0,9cm, *L. acidophilus* 1,1 e 0,8cm e 1,1 e 0,9cm, enquanto que para *L. fermentum* isolado da cloaca o halo foi de 1,2cm. Os halos de inibição entre os *Lactobacillus* da cloaca e vagina dentro da mesma espécie não apresentaram diferença.

Em nosso trabalho, os resultados das repetições das médias demonstraram que todas as espécies de *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. sp.*, provenientes do ingluvío e cecos de aves, inibiram *in vitro* todas as cepas de *Salmonella*.

Segundo OYARZABAL *et al.* (1995), *L. casei* e *L. acidophilus* foram utilizados para avaliação da inibição *in vitro* frente a *Salmonella* California, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Mission*, *S. Senftenberg* e *S. Typhimurium*. Observando que a média das quatro repetições de *L. casei* e *L. acidophilus* respectivamente, variou de 0,5 a 1,6mm e 0,4 a 1,2mm para inibição dos sorotipos, as amostras de *Lactobacillus* apresentaram halos de inibição contra todos os sorotipos de *Salmonella*.

REQUE *et al.* (2000) reportaram que *L. fermentum* isolado dos cecos, apresentou atividade inibitória *in vitro* frente à *S. Typhimurium* mas não a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Enquanto APELLA *et al.* (1992) observaram que *L. acidophilus* e *L. casei* isolados de fezes de crianças saudáveis apresentaram atividade inibitória contra *Shigella sonnei*.

CHATEAU *et al.* (1993), avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de *Lactobacillus fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. pseudoplatarum* presentes em dois probióticos frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*. Os *Lactobacillus* foram mais eficientes contra as cepas de *Salmonella*, um dos probióticos apresentou mais eficiência contra *S. Typhimurium*, mas o oposto foi observado no outro probiótico que apresentou ação contra *S. Enteritidis*.

A seleção de amostras para se produzir cultura definida e efetiva, e a inclusão de bactérias com propriedades inibitórias com atividade contra *Salmonella* melhorarão a eficácia dos probióticos e produtos de EC.

Durante muitos anos tem sido investido esforços no desenvolvimento de métodos simples, rápido e discriminativo para identificação de bactérias ácido lácticas (LAB), incluindo os *Lactobacillus*. Atualmente a PCR vem sendo utilizada para classificação e identificação das LAB, visando fornecer uma identificação precisa e seguro biotecnológico.

8. CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- A caracterização do gênero *Lactobacillus* pôde ser realizada com base nos testes de coloração pelo método de Gram, catalase, produção de gás em glicose e H₂S em TSI.
- A comparação entre os métodos bioquímico e PCR para identificação das espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío e cecos de aves, revelou que o método da PCR apresentou-se mais sensível, com resultados diferentes do método bioquímico.
- Todas as espécies de *Lactobacillus* isoladas do ingluvío e cecos de aves apresentaram amostras que inibiram *in vitro* *S. Enteritidis* fagotipo 4, *S. Enteritidis* fagotipo 28, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Dublin* e *S. Senftenberg*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. food. Microbial.**, v. 28, p. 169-85, 1995.
- AGUIRE, A.A., QUAN, T.J., COOK, R.S., MCLEAN, R.G. Cloacal flora isolated from wild Black-Bellied Whistling Ducks (*Dendrocygna autumnalis*) in Laguna La Nacha, Mexico. **Avian Dis.**, v. 36, p. 459-62, 1992.
- ALAKOMI, H. L., SKYTТА, E., SAARELLA, M., MATILLA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Appl. Environ. Microbial.**, v. 66, p. 2001-5, 2000.
- ANDERSSON, R.E., DAESCHEL, M.A., ASAN, H.M. Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Biochimie**, v. 70, p. 381-90, 1988.
- ANDREATTI FILHO, R.L., SILVA, E.N., CURI, P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbica no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 49, p. 661-72, 1997.
- ANDREATTI FILHO, R.L., SILVA, E.N., CURI, P.R. Control of experimental infection of broilers by *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* with the use of organic composites and anaerobic cecal microflora. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE SALMONELLA IN POULTRY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: American Association of Avian Pathology, 1998. p. 53.
- ANNUK, H., SHCHEPETOVA, J., KULLISAAR, T., SONGISEPP, E., ZILMER, M., MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 3, p. 403-12, 2003.
- AMMAN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 143-69, 1995.
- APELLA, M.C., GONZALEZ, S.N., MACIAS, M.E.N., ROMERO, N., OLIVER, G. *In vitro* studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. Acidophilus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 480-3, 1992.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BABA, E., NAGAISHI, S., FUKATA, T., ARAKAWA, A. The role microflora intestinal on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens. **Poult. Sci.**, v. 70, p. 1902-7, 1991.
- BAELE, M., VANEECHOUTTE, M., VERHELST, R., VANCANNEYT, M., DEVRIESE, L.A., HAESEBROUCK, F. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. **J. Microbiol. Methods.**, v. 50, p. 263-71, 2002.
- BAILEY, J.S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A summary of work at Russel Research Center. **Poult. Sci.**, v.72, p. 1169-73, 1993.
- BAREFOOT, S.F., KLAENHAMMER, T.R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 1808-15, 1983.
- BARNES, E.M., IMPEY, C.S., COOPER, D.M. Competitive exclusion of salmonellas from the newly hatched chick. **Vet. Rec.**, v. 106, p. 61, 1980.
- BERCHIERI JÚNIOR, A., IRINO, K., NEME, S.N., PAULILLO, A.C., CALZADA, C.T., FERREIRA, S.A., PESSÔA, G.V.A. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 4, p. 83-88, 1984.
- BERCHIERI JÚNIOR, A., ADACHI, S.Y., CALZADA, C.T., PAULILLO, A.C., SCHOKEN-ITURRINO, R.P., TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 9, p. 9-12, 1989.
- BERCHIERI JÚNIOR, A., FERNANDES, S.A., IRINO, K., QUINTANA, J.L., SANTOS, A. J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Rev. Microb.**, v. 24, p. 22-25, 1993.
- BERTHIER, F., EHRLICH, S.D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S /23S rRNA spacer region. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.161, p.97-106, 1998.
- BLACKBURN, P., POLAK, J., GUSIK, S. A., RUBING, S.D. Nisin Composition for use as enhanced broad range bactericides. **Int patent application publication**, 1991.
- BORCH, E., MOLIN, G. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v. 54, p. 301-23, 1988.
- BUCHANAN, R.E., GIBBONS, N.E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- CHAGNAUD, P., MACHINIS, K., COUTTE, L.A., MARECAT, A., MERCENIER, A. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. **J. Microbiol. Methods**, v.44, p.139-48, 2001.

- CHATEAU, N., CASTELLANOS, I., DESCHAMIS, A .M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolation of a commercial probiotic consortium. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 74, p.36-40, 1993.
- CHAVES, A .H., SILVA, J.F.C., PINHEIRO, A . J.R., CAMPOS, O .F., VALADARES FILHO, S.C. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. **Rev. Bras. Zootec.**, v.28, p. 1086-92, 1999.
- COCCONCELLI, P.S. Aspetti molecular de batteriocine prodolte da *Lactobacillus* **Ann.Microbiol. Enzimol.**, v. 43, p. 37-44, 1993.
- COLLINS, E.B., HARTLEIN, K. Influences of temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks. **J. Dairy Sci.**, v. 65, p. 883-6, 1982.
- CONWAY, P.L., GORBACH, S.H., GOLDIN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, v. 70, p. 1-12, 1987.
- CORRIER, D.E., NISBET, D.J., SCANLAN, C.M., HOLLISTER, A .G., CALDWELL,D.J., THOMAS, L.A . , HARGIS, M., TOKIS,T., DeLOACH, J.R. Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce *Salmonella* colonization. **Poult. Sci.**, v. 72, p. 1093-101, 1995.
- COSBY, D.E., CRAVEN, S.E., HARRISON, M.A., COX, N.A. Bacterial Isolates from the Chicken Gizzard and Ceca with In Vitro Inhibitory Activity against *Salmonella typhimurium*. **J. Food. Prot.**, v. 60, n. 2, p. 120-4, 1997.
- DAVIS, G.H. The classification of lactobacilli from the human mouth. **J. Gen. Microbiol.**, v. 13, p. 481-93, 1955.
- DAY, C. A. **Competitive exclusion in poultry**: a review. Worcessershire: Life- Care Products, 1992. 18p.
- De KLERK, H.C., COETZEE, J.N. Bacteriocinogeny in *Lactobacilli fermenti*. **Nature**, v. 214, p. 609, 1967.
- De KLERK, H.C., SMIT, J.A. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. **J. Gen. Microbiol.**, v. 48, p. 309-16, 1967.
- De MARTINIS, E.C.P. Identification of meat isolated bacteriocin- producing lactic acid bacteria using biotyping and ribotyping. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, n. 6, p. 659-61, 2002.
- De MARTINIS, E.C.P., PÚBLIO, M.R.P., SANTAROSA, P.R . Antilisterial activity of lactic bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 32-7, 2001.
- DiMICHELE, L.J., LEWIS, M.J. Rapid, especies-specific detection of acid lactic bacteria from beer using the polymerase chain reaction. **Am. Soc. Brewing Chem. J.**, v. 51, p. 63-6, 1993.

- DRAGO, L., GISMONDO, M.R., LOMBARDI, A., DE HAËN, C., GOAANI, L. Inhibition of *In vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 153, p. 455-63, 1997.
- DRAKE, M., SMALL, C.L., SPENCE, K.D., SWANSON, B.G. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. In dairy products by using the polymerase chain reaction. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 1031-6, 1996.
- DUGUID, J.P., NORTH, R.A.E. Eggs and *Salmonella* food-poisoning: An evaluation. **J. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 65-72, 1991.
- ERHMANN, M.A., KURZAK, P., BAUER, J., VOGEL, R.F. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, p. 966-75, 2002.
- FALCÃO, D.P., VALENTINI, S.R., LEITE, C.Q.F. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara, Brazil. **Wat. Res.**, v. 27, p. 1737- 41, 1993.
- FULLER, R. Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 36, p. 131-9, 1973.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p. 365-78, 1989.
- FULLER, R., GIBSON, G.R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 32, p. 28-31, 1997.
- FUJISAWA, T., BENNO, Y., YAESHIMA, T., MITSUOKA, T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* A3 (Johnson *et al.*, 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 487-91, 1992.
- HACKING, W.C., MITCHELL, W.R., CARLSON, H.C. Sources of *Salmonellae* in broiler chickens in Ontario. **Can. J. Comp. Med.**, v. 42, p. 392-99, 1978.
- HOFER, E., SILVA FILHO, S.J., REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 17, p. 55-62, 1997.
- GARRIGA, M., PASCUAL, M., MONFORT, J.M., HUGAS, M. Selection of *Lactobacilli* for chicken probiotic adjuncts. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 125-32, 1998.
- GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Antagonistic action of *Lactobacillus Acidophilus* towards intestinal and foodborne pathogens in associated cultures. **J. Food. Prot.**, v. 40, p. 820-3, 1977.

- GLEESON, T.M., STRAVIC, S., BLANCHFIELD, B. Progress in the development of pure culture mixtures for competitive exclusion of *Salmonella* from young chicks. In: **ANNUAL MEETING CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES**, 67, 1986, Chicago. **Abstracts...** Chicago, 1986. p.33.
- GUSILS, C., CHAIA, A.P., GONZALEZ, S., OLIVER, G. *Lactobacilli* isolated from the chicken intestines: potential use as probiotics. **J. Food. Prot.**, v.62, p. 252-6, 1999.
- HAMMES, W.P., VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD-BRIAN, J.B., HOLZAPFEL, W.H. (Eds). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie, 1995. p. 19-54.
- HARRY, E.G. Some observations on the bacterial content of the ovary and oviduct of the fowl. **Br. Poult. Sci.**, v. 4, p. 63-70, 1963.
- HAVENAAR, R., HUIS in't VELD, J.H.J. Probiotics: a general view. The lactic acid bacteria. In: WOOD, B.J.B. (Ed). **The lactic acid bacteria in health and disease**. Essex: Elsevier Applied Science, 1992. p. 151-70.
- HAVENAAR, R., BRINK, B.T., HUIS VELD, J.H.H., FULLER, R. Selection of strains for probiotics use. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 209-24.
- HENSIEK., R., KRUPP, G., STACKEBRANDT, E. Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 15, p. 123-8, 1992.
- HERTEL, C., LUDWIG, W., OBST, M., VOGEL, R.F., HAMMES, W., SCHLEIFER, K.H. 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the rapid identification of meat lactobacilli. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 14, p. 173-7, 1991.
- HINTON, A., CORRIER Jr., D.E., DeLOACH., J.R. Inhibition of the growth of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O 157:H17 on chicken feed media by bacteria isolated from the intestinal microflora of chickens. **J. Food. Prot.**, v. 55, p. 419-23, 1992.
- HOSONO, A., YASTUKI, K., TOKITA, F. Isolation and characterization of an inhibitory substance against *Escherichia coli* produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Milchwissenschaft**, v. 32, p. 727-30, 1977.
- HUDAULT, S., BERNET-CARMOT, V.L.M., SERVIN, A. Antagonist activity exerted *In vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 513-8, 1997.
- HUIS IN'T VELDT, J.H.J., SHORTT, C. **Selection criteria for probiotic microorganisms**. Gut flora and Health: past, present and future. London: The Royal Society of Medicine Press, 1996. p.27-36. (International Congress and Symposium Series, v.219).

- IKUTA, N. Diagnóstico de doenças em aves através da biologia molecular. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. **Anais**... Campinas, 1999. p. 103.
- IMPEY, C.S., MEAD, G.C., GEORGE, S.M. Competitive exclusion of *Salmonella* from the chick caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird. **J. Hyg.**, v.89, p. 479-90, 1982.
- IMPEY, C.S., MEAD, G.C., GEORGE, S.M. Evaluation of treatment with defined and undefined mixtures of gut microorganisms for preventing *Salmonella* colonization in chicks and turkeys poults. **Food Microbiol.**, v.1, p.143-7, 1984.
- JACOBS, L.A., MCDANIEL, G.R., BROUGHTON, C.W. Microbial flora observed within sections of the oviduct in naturally mated, artificially inseminated, and virgin hens. **Poult. Sci.**, v. 57, p. 1550-3, 1978.
- JIN, L.Z., HO, Y.W., ALI, M.A., ABDULLAH, ALI., JALALUDIN, S. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. Asian Australasian. **J. Anim. Sci.**, v.9, p. 397-404, 1996.
- JIN, L.Z., HO, Y.W., ALI, M.A., ABDULLAH, ALI., JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World Poult. Sci J.**, v. 53, p. 351-68, 1997.
- JOHNSON, J.L, PHELPS, C.F., CUMMINS, C.S., LONDON, J., GASSER, F. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30, p. 53-8, 1980.
- JUVEN, B.J., MEINERSMANN, R.J., STERN, N.J. Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 70, p. 95-103, 1991.
- JUVEN, B.J., SCHVED, F., LIDNER, P. Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Food. Prot.**, v. 55, p. 157-61, 1992.
- KANDLER, O., WEISS, N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v. 2, p. 1209-34.
- KANDLER, O., STERTTER, K., -O., KÖHL, R. *Lactobacillus reuteri* sp. Nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. **Zentralbl. Bakteriol. Orig.**, C1, p. 264-9, 1980.
- KAWAGUCHI, I., HAYASHIDANI, H., KANEKO, K., OGAWA, M., BENNO, Y. Bacterial flora of the respiratory tracts in chickens with a particular reference to *Lactobacillus* species. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 54, p. 261-7, 1991.
- KLAENHAMMER, T.R. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. **Int. Dairy J.**, v.8, p.497-505, 1998.

- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of intestinal lactobacilli. **Int. Dairy. J.**, v. 5, p. 1019-58, 1995.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v.41, p. 103-25, 1998.
- KLERK, H.C., COETZEE, J.N. Antibiotics among *Lactobacilli*. **Nature.**, v.192, p.340, 1961.
- KURZAK,P., EHRMANN, A, VOGEL, R.F. Diversity of Lactic Bacteria Associated with Ducks. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 21, p. 588-92, 1998.
- LAUER, E., HELMING, C., KANDLER, O. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. **Zentralbl. Bakteriол. Orig.**, C1, p. 150-68, 1980.
- LEE, J., AMETANI, A., ENOMOTO, A., SATO, Y., MOTOSHIMA, H., IKE, F., KAMIGOGAWA, S. Screening for the immunopotentiating activity of food microorganisms and enhancement of the immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.57, p. 2127-32, 1993.
- LERCHE, M., REUTER,G. Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stabchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen. **Zentralbl. Bakteriол. Orig.**, v. 185, p. 446-81, 1962.
- LEWUS, C.B., KAISER, A ., MONTIVILLE, T.J. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 6, p. 1683-8, 1991.
- LILLY, D.M., STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.**, v. 147, p. 747-8, 1965.
- MCSWEENEY, C.S., MACKIE, R.I., ODENYO, A.A., STAHL, D.A. Development of an oligonucleotide probe targeting 16S rRNA and its application for detection and quantitation of the ruminal bacterium *Synergistes jonesii* in a mixed population chemostat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p.1607-12, 1993.
- MEAD, G.C., IMPEY., C.S. Towards the development of a defined gut-flora treatment for reducing *Salmonella* carriage in turkeys. **Turkeys**, v.32, p. 29-33, 1984.
- MEAD, G.C., IMPEY, C.S. The present status of the Nurmi concept for reducing carriage of food-poisoning salmonellae and other pathogens in live poultry. In: SMULDERS,F.J.M. **Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry**. Amsterdam: Elsevier ,1987. p. 57-77.
- METCHINIKOFF, E. **Prolongation of life**. New York: Putnam, 1907.

- MICOLAJCIK, E.M., HAMDAN, I.Y. *Lactobacillus acidophilus*. I. Growth characteristics and metabolic products. **Cult. Dairy. Prod. J.**, v. 10, p.10, 1975.
- MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: ALTECH BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 1993, Florida. **Proceedings...** Florida, 1993. p. 133-50.
- MITEVA, V.I., ABADJIEVA, A.N., STEVFANOVA, TZ.T. M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactobacillus* spp. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 349-54, 1992.
- MITSUOKA, T. The human gastrointestinal tract. The *Lactic Acid Bacteria*. In: WOOD, B.J.B. (Ed). The lactic acid bacteria in health and disease. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 49-114.
- MIYAMOTO, T., BABA, E., TANAKA, T., SASAI, K., FUKATA, T., ARAKAWA, A. *Salmonella enteritidis* contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Dis.**, v. 41, p. 296-303, 1997.
- MIYAMOTO, T., T., HORIE ., FUKATA, T., SASAI, K., BABA, E. Changes in microflora of the cloaca and oviduct of hens after intracloacal or intravaginal inoculation with *Salmonella enteritidis*. **Avian Dis.**, v. 42, p. 536-44, 1998.
- MIYAMOTO, T., HORIE, T., FUJIWARA,T., FUKATA,T., SASAI, K., BABA, E. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella enteritidis* *In vitro*. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 7-11, 2000.
- MOLIN, G., JEPPSON, B., AHRNE, M.L., NOBAEK, S., STAHL, M., BENGMARK,.S. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. Associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 74, p. 314-23, 1993.
- MOLIN, G., JOHANSSON, M.L., STAHL, M., AHRNÉ, S., ANDERSSON, R., JEPPSSON, B., BENGMARK, S. Systematics of the *Lactobacillus* population on rat intestinal mucosa with special reference to *Lactobacillus reuteri*. **Antonie. Van. Leeuwenhoek.**, v. 61, p. 175-83, 1992.
- MORELLI, L. Probiotics: selecting and characterising strains. **Flair-Flow Rep.**, v. 127, p. 94, 1994.
- MORISHITA, T.Y., AYE, P.P., HARR, B.S., COBB, C.W., CLIFFORD, J.R. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce of colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. **Avian Dis.**, v.41, p. 850-5, 1997.
- MORISHITA, Y., SHIROMIZU, K. Characterization of lactobacilli from meats and meats products. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 53, p. 2683-85, 1986.
- NISSEN, H., DAINITY, R. Comparison of the use of rRNA probes and conventional methods in identifying strains of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* isolated from meat. **J. Food Microbiol.** v.25, p. 311-5, 1995.

- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. **Res. Microbiol.**, v. 149, p. 433-48, 1998.
- NURMI, E., RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature.**, v.241, p. 210-1, 1973.
- OLIVEIRA D.E. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe.** 2002. 117p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- OYARZABAL, O.A., CONNER, D.E. In vitro fructoolisaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. **Poult Sci.**, v. 74, p. 1418-25, 1995.
- PASCUAL, M., HUGAS, M., BADIOLA, J.I., MONFORT, J.M., GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 Prevents *Salmonella enteritidis* Colonization in Chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4981-6, 1999.
- PRADO, C.S., SANTOS, W.L.M., CARVALHO, C.R., MOREIRA, E.C., COSTA, J.O. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 4, p. 417-23, 2000.
- PELCZAR, M.J., REID, R., CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Mcgraw Hill, 1981. p. 1072.
- POT, B., HERTEL, C., LUDWIG, W., DESCHEEMAER, P., KERSTERS, K., SCHLEIFER, K.H. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 513-7, 1993.
- POT, B., LUDWIG, W., KERSTERS, K., SCHLEIFER, K. H. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: DE VUYST, L., VANDAMME, E.J. (Eds). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**: microbiology, genetics and applications. London: Blackie, 1994. p. 1-89.
- REDONDO-LOPEZ, V., COOK, R.L., SEBEL, J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vagina bacterial microflora. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 856-72, 1990.
- REEVES, P. The bacteriocins. **Bacteriol. Rev.**, v.29, p. 24, 1965.
- REID, G., BRUCE, W., MCGROARTY, J.A., CHENG, K.J., COSTERTON, J.W. Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 335-44, 1990.

- REQUE, E.F., PANDEY, A., FRANCO, S.G., SOCCOL, C.R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* Ipb for use as probiotic in chickens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 303-7, 2000.
- RETTGER, L.F., CHAPLIN, H.A. **Treatise on the intestinal flora with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus***. New Haven: Yale University Press, 1921.
- REUTER, G. Was ist unter Döderlein-Bakterien zu verstehen? 12. Internationale Tagung über Infektionen in der Gynäkologie, Geburtshilfe und Urologie, München, February, 15. 1997.
- SAARELLA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- SALANITRO, J.P., BLAKE, I.G., MUIRHEAD, P.A., MAGLIO, M., GOODMAN, J.R. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 35, p. 782-90, 1978.
- SALMINEN, S., DEIGHTON, M.A., BENNO, Y., GORBACH, S. Lactic acid bacteria in health and disease, In: SALMINEN, S., VON WRIGHT A. (Eds). **Lactic acid bacteria, microbiology, and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.211-53.
- SANTOS, W.L.M. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 1993. 294p. (Tese Doutorado).
- SARRA, P.G., MAGRI, M., BOTTAZZI, V., DELLAGLIO, F., BOSI, E. Frequenza di bacilli lattici eterofermentati nelle feci di vitelli lattanti. **Arch. Vet. Ital.**, v. 30, p. 16-21, 1979.
- SARRA, P.G., MORELLI, L., BOTTAZZI, V. The lactic acid microflora of fowl. In: WOOD, B.J.B. (Ed). **The lactic acid bacteria in health and diseases**. London: Elsevier, 1992. p. 3-19.
- SCHLEIFER, K.H., LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 18, p. 461-7, 1995.
- SCHILLINGER, U., LUCKE, F.K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiol.**, v. 4, p.199-208, 1987.
- SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poult. Sci.**, v. 71, p. 2125-8, 1992.
- SCHOENI, J.L., GLASS, K.A., McDERNOTT, J.L., WONG, A.C.L. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. **Int. J. Food Microbiol.**, v.24, p. 385-96, 1995.

- SEKINE, K., TOIDA, T., KAWASHIMA, T., KATOAKA, T., HASHIMOTO, Y. Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for in vivo immune responses in mice. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 16, p. 589-609, 1994.
- SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus*. In: _____. **The Prokaryotes**. [S. l.: s.n.] 1981. v. 2, p. 1653.
- SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M. E., HOLT, J.G. (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1239.
- SONG, Y.L., KATO, N., LIU, C.X., MATSUMIYA, Y., KATO, H., WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 187, p. 167-73, 2000.
- STILES, M.E., HOLZAPFEL, H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.**, v.36, p. 1-29, 1997.
- STRAVIC, S. Microbiol colonization control of chickens intestine using defined cultures. **Food Technol.**, v. 43, p. 93-8, 1987.
- STRAVIC, S., GLEESON, T.M., BLANCHFIELD, B., PIVNICK, H. Competitive exclusion of *Salmonella* from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adult birds. **J. Food Prot.**, v.48, p.778-82, 1985.
- STRAVIC, S., GLEESON, T.M., BLANCHFIELD, B., PIVNICK, H. Role of adhering microflora in competitive exclusion of *Salmonella* from young chicks. **J. Food Prot.**, v. 50, p. 928- 32, 1987.
- TAGG, T., SAMANT, S.K., ITOH, T. Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 102-4, 1991.
- TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 527- 33, 1998.
- TANNOCK, G.W., SAVAGE, D.C. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, v. 9, p. 591-8, 1974.
- TANNOCK, G.W., TIMISJARVI-TILSALA, A., RODTONG, S., NG, J., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4264-7, 1999.
- TAUXE, R.V. Forward: transmission of human bacterial pathogens through poultry (Banquet adress). In: BLANKENSHIP, L.C. (Ed). **Colonization control of human bacterial enteropathogens**. New York: Academic Press, 1991. p. 15-23.

- TORRIANI, S., ZAPPAROLI, G., DELLAGLIO, F. Use of PCR- Based Methods for Rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *L. Delbrueckii* subsp. *Lactis*. **J. Food Prot.**, v. 65, p. 4351- 6, 1999.
- TORTUERO, F. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the grown, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. **Poult. Sci.**, v. 52, p. 197- 203, 1973.
- TYNKKYNNEN, S., SATAKARI, R., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., SAXELIN, M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.3908-14, 1999.
- VALDEZ, G.F., GIORI, G.S., OLIVER, G., RUIZ HOLGADO, A .P. Development and optimization of na inexpensive microsystem for the biochemical characterization of lactobacilli. **Microbiol. Aliments Nutr.**, v. 11, p. 215-9, 1993.
- VAUGHAN, E.E., HEILIG, H.G.H., ZOETENDAL, E.G., SATOKARI, R., COLLINS, J.K., AKKERMANS, A.D.L., VOS, W.M. Molecular approaches to study probiotic bacteria. **Trends Food Sci. Technol.**, v.10, p.400-4, 1999.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS., KERTERS, P., SWING, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Rev. Microbiol.**, v.60, p.407-38, 1996.
- VELDMAN, A., VAHL, H. A., BORGGREVE, G.J., FULLER, D.C. Survey of the incidence of *Salmonella* species and *Enterobacteriaceae* in poultry feeds and feed components. **Vet. Rec.**, v. 136, p. 169-72, 1995.
- VICENT, J.G., VEONETT, R.C., RILEY, R.G. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **J. Bacteriol.**, v. 78, p. 477-84, 1959.
- VOGEL, R.F., MULLER, M., STOLZ, P., EHLMANN, M.A. Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. **Adv. Food. Sci.**, v. 18, n. 5/6, p. 152-9, 1996.
- YASUI, H., OHWAKI, M. Enhancement of immune response in Peyer patcher cells cultured with *Bifidobacterium breve*. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 1187-95, 1991.
- YUAN-KUN, L., SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, v.6, p. 241-5, 1995.
- WALTER, J., TANNOCK, G.W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., LOACH, D.M., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis and species-specific PCR primers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 297-303, 2000.

- WATKINS, B.A., MILLER, B.F. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. **Poult. Sci.**, v. 62, p. 1772-9, 1983.
- WESNEY, E., TANNOCK, G.W. Association of rat, pig and fowl biotypes of lactobacilli with the stomach of gnotobiotic mice. **Microbiol. Ecol.**, v.5, p.35-42, 1979.
- ZACCONI, C., PALADINO, M., SARRA, P.G., BOTTAZZI, V. Bactériocines produites par *Lactobacillus reuteri*. **Microbiol Aliments Nutr.**, v. 3, p. 153-6, 1985.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1996. p. 718.
- ZHONG, W., MILLSAP, K., BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H., REID, G. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.2418-23, 1998.
- ZIPRIN, R.L., CORRIER, D.E., DeLOACH, J.R. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with in vivo passaged anaerobes. **Avian Dis.**, v. 37, p. 183- 8, 1993.