

Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a Partir de Fezes de Bezerros¹

Antônio Hamilton Chaves², José Fernando Coelho da Silva³, Adão José Rezende Pinheiro⁴,
Oriel Fajardo de Campos⁵, Sebastião de Campos Valadares Filho³

RESUMO - Este experimento foi realizado para isolar, caracterizar e identificar estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de fezes de bezerros com 1 - 3 dias de idade, coletadas diretamente no reto. Os seguintes testes para caracterização dos isolados foram feitos: morfologia celular, teste de gram, catalase, produção de gás a partir da glicose, crescimento a 15 e 45°C, redução do "Litmus milk", crescimento no meio com 4 e 8% de cloreto de sódio, hidrólise de arginina, redução do nitrato e fermentação de diferentes "carboidratos". De um total de 526 "isolados" iniciais, 12 (2,28%) estirpes de *Lactobacillus acidophilus* foram identificadas.

Palavras-chave: bezerro, *Lactobacillus acidophilus*, probiótico

Isolation of *Lactobacillus acidophilus* from Calves Feces

ABSTRACT - This work was carried out to isolate, characterize and identify *Lactobacillus acidophilus* strain from calves feces with 1-3 days of age, collected directly from the rectum. The following tests for the characterization of the isolates were done: cellular morphology, gram test, catalase, gas production from glucose, growth at 15 and 45°C, Litmus milk reduction, growth in culture medium with 4 and 8% sodium chloride, arginine hydrolysis, nitrate reduction and fermentation of several "carbohydrates". From a total of 526 initial isolates, 12 (2.28%) strain of *Lactobacillus acidophilus* were identified.

Key Words: calves, *Lactobacillus acidophilus*, probiotics

Introdução

Acompanhando o avanço das técnicas de criação de animais domésticos, os probióticos estão sendo cada vez mais usados em todo o mundo, particularmente no Japão, onde estão presentes na maioria das raças. O crescimento da inquietação pública, quanto ao uso de antibióticos nas raças para animais e a seus possíveis problemas, toxicidade, alergias e principalmente como possíveis causadores do desenvolvimento da resistência de estirpes patogênicas, tem estimulado o interesse pelos probióticos como terapia alternativa.

Diversos microrganismos são usados como probióticos, sendo as bactérias lactobacilos e streptococos e os fungos, incluindo a levedura, *Saccharomyces cerevisiae* e o *Aspergillus oryzae*, as mais usadas. Entre os lactobacilos, um dos mais indicados para o preparo de probióticos é o *Lactobacillus acidophilus*.

O uso terapêutico dos lactobacilos na prevenção ou cura de diversas desordens gastrintestinais é conhecido há muitos anos: leites fermentados como o

iogurte, Koumiss e Kefir, foram usados na Europa muito antes de se falar em bactéria. Hoje se sabe que o *Lactobacillus acidophilus* produz, além de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, substâncias tipo antibióticos (bacteriocinas), que inibem o crescimento de várias bactérias, incluindo a *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. - principais causadoras de desordens gastrintestinais em bezerros.

No presente trabalho, procurou-se isolar, caracterizar e identificar estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de fezes de bezerros com 1 a 3 dias de idade, que possam ser usadas como probiótico.

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As amostras fecais foram coletadas em 10 fazendas das regiões de Coronel Pacheco e Viçosa, MG.

As amostras de fezes foram obtidas de 16 bezerros com 1 a 3 dias de idade. Após massagem retal, a

¹ Parte do trabalho de Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada ao Departamento de Zootecnia da UFV, Viçosa, MG. Parcialmente financiado pela FAPEMIG e EMBRAPA/CNPGL.

² Professor da Escola Agrotécnica Federal de Uberaba, Uberaba-MG.

³ Professor do DZO, UFV, Viçosa, MG, Bolsista do CNPq.

⁴ Professor do DTA, UFV, Viçosa, MG, Bolsista do CNPq.

⁵ Pesquisador da EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, MG.

evacuação foi colhida em recipientes esterilizados, mantidas em caixas de isopor com gelo e água, conduzidas ao laboratório e, em seguida, preparadas e diluídas na razão de 1:9 (25 gramas de fezes em 225 mL de solução tampão fosfato, pH 7,2).

As amostras devidamente diluídas foram plaqueadas “pour plate” (10^{-5} a 10^{-8}) em duplicata no meio agar, seletivo para lactobacilos, desenvolvido por Rogosa - ROGOSA SL - (KANDLER e WEISS, 1986), sendo incubadas a 37°C por 48 horas, em condições de microaerofilia, obtida com uma vela na jarra de incubação devidamente fechada (PELCZAR et al., 1981).

Após contagem total, com auxílio de um contador de colônias, as placas contendo colônias bem definidas foram selecionadas para realização do isolamento. Várias colônias foram isoladas e transferidas para tubos contendo o meio de cultura DE MAN, ROGOSA e SHARPE (MRS), desenvolvido por DE MAN et al. (1960), enriquecido com 0,15% de sais biliares (GILLILAND e SPECK, 1977). Procurou-se isolar colônias tipo X ou rugosa, pois as estirpes que formam estas colônias são de comprovado valor terapêutico (Prescott e Dunn, 1940, citados por SANTOS, 1984).

Após 48 horas de incubação a 37°C, as culturas com crescimento evidenciado foram plaqueadas por estrias no agar Rogosa SL e incubadas, novamente, sob baixo teor de oxigênio, a 37°C durante 48 horas, para posterior reisolamento. Nesta etapa, várias colônias (uma ou duas de cada placa) foram transferidas para tubos contendo leite desnatado reconstituído (LDR) com 12% de extrato seco desengordurado (ESD) esterilizado, sendo incubadas a 37°C até coagulação. As culturas que coagularam o LDR foram reativadas no caldo MRS (DE MAN et al. 1960), a 37°C durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas ao teste de gram e às análises morfológicas. As culturas “impuras” foram novamente plaqueadas em estrias para novo reisolamento. As culturas puras, bastonetes gram-positivos, foram congeladas a -15°C. Um tubo de cada isolado foi mantido em atividade, para continuidade aos testes necessários à caracterização e identificação.

Além da coloração de gram (PELCZAR et al., 1981), as culturas foram submetidas aos testes de catalase, produção de gás a partir da glicose, capacidade em coagular o leite a 15 e 45°C, redução do “Litmus milk”, crescimento em 4 e 8% de cloreto de sódio, hidrólise da arginina, redução do nitrato e fermentação de diferentes “carboidratos”.

Para o teste da catalase, seguiu-se metodologia de SPECK (1984), sendo as culturas semeadas por

meio de estrias no agar MRS inclinado. Após incubação, a 37°C por 48 horas, realizou-se o teste adicionando sobre as colônias, 1 mL de peróxido de hidrogênio a 3,5%, observando-se a formação de bolhas, que caracterizam resultado positivo.

Para a avaliação da produção de gás a partir da glicose, as culturas foram inoculadas no caldo MRS modificado (contendo 5% de glicose e isento de extrato de carne) e incubadas a 37°C por 48 horas, em tubos contendo em seu interior um tubo de Durhan, para verificar a produção de gás (COLLINS e HARTLEIN, 1982).

Na determinação da capacidade dos isolados em coagular o leite a 15 e 45°C, estes foram previamente ativados em LDR (10% ESD), inoculados (1%) em tubos contendo 8 mL de LDR (10% ESD) esterilizado a 121°C por 15 minutos e incubados a 15°C por 30 dias e a 45°C por 72 horas. O teste foi considerado positivo quando ocorreu coagulação do leite nos períodos indicados (KANDLER e WEISS, 1986).

No teste de redução do “Litmus milk”, os isolados foram inoculados (1%) no meio comercial “Litmus milk” (BBL), previamente esterilizado, e incubados a 37°C por 48 horas. A redução do indicador foi confirmada pela mudança da coloração do meio de lilás para incolor (SKERMAN, 1959).

A capacidade de crescimento dos isolados a 4 e 8% de cloreto de sódio foi definida com o emprego de caldo MRS, adicionado destas concentrações de cloreto de sódio. Os isolados foram inoculados (1%) e incubados a 37°C por 48 horas. Após esse período, a capacidade de crescimento foi avaliada comparando-se visualmente a turbidez dos meios inoculados com o controle, que continha inóculo e apenas 0,5% de cloreto de sódio (DAVIS, 1955).

Para o teste de hidrólise da arginina, as culturas previamente ativadas foram inoculadas no caldo descarboxilase base contendo 0,002% de púrpura de bromocresol como indicador, 0,5% de hidrocloreto de arginina e pH ajustado a 6,8 com solução diluída de hidróxido de sódio ou ácido láctico (MIKOLAJCIK, 1964; COWAN e STEEL, 1965). Óleo mineral foi adicionado aos tubos, proporcionando ambiente anaeróbico necessário à reação. Utilizaram-se, como controle, tubos sem adição de arginina. Os isolados foram inoculados (1%) e incubados a 37°C por 48 horas. Coloração violeta (após ocorrência da amarela) indicava resultados positivos e a amarela, resultados negativos (BIER, 1985).

No teste de redução do nitrato, utilizou-se o caldo nitrato (Bacto) contendo 0,1% de nitrato de potássio.

Adicionou-se, a este meio, caldo MRS na proporção de 1:1. O caldo nitrato não possuía todos os componentes requeridos para o crescimento dos lactobacilos. O pH foi ajustado a 6,8 com solução diluída de hidróxido de sódio ou ácido láctico. As culturas foram inoculadas a 1% e incubadas a 37°C por 48 horas em condições de microerofilia. A redução do nitrato foi definida com o aparecimento de coloração vermelha ou marrom, após adição do reativo de Griess-iiIosva, conforme COLLINS (1969). A presença de nitrato residual no meio incolor foi indicada pelo aparecimento da cor vermelha, após adição de zinco em pó (NORRIS e RIBBONS, 1971).

O teste de fermentação de diferentes “carboidratos” foi realizado em duas etapas:

A - Na primeira etapa, empregou-se o caldo MRS modificado, omitindo-se o extrato de carne e a glicose e adicionando-se 0,002% de púrpura de bromocresol como indicador. Empregou-se 1% de cada “carboidrato” teste (arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, glicose, manitol, maltose, manose, sacarose, salicina, sorbitol e xilose). Os “carboidratos” e o meio foram esterilizados isoladamente. As culturas foram incubadas a 37°C por até sete dias. O aparecimento da cor amarela após incubação indicava resultados positivos (DAVIS, 1955; KANDLER e WEISS, 1986).

B - Em uma segunda etapa, os isolados que apresentaram características, até então próprias do *Lactobacillus acidophilus*, foram submetidos ao “Rapid CH (carbohydrates) strips” (teste API, sistema API de identificação bioquímica ou API 50 CH). Neste teste, os isolados foram avaliados quanto às suas capacidades de fermentação de 49 “carboidratos” ou substâncias diferentes.

Resultados e Discussão

Nas amostras plaqueadas “pour plate” em duplicata, no meio agar rogosa SL, e incubadas sob baixo teor de oxigênio a 37°C por 48 horas, a contagem de células viáveis teve como média $4,7 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes. GILLILAND et al. (1975), usando o agar seletivo para lactobacilos (LBS) para a contagem de lactobacilos em fezes de humanos, suínos e frangos, encontraram $1,3 \times 10^8$; $9,7 \times 10^8$; e $7,5 \times 10^8$ UFC por gramas de fezes nas respectivas amostras. PAULO (1991), trabalhando com o meio LBS para plaqueamento de fezes suínas, encontrou $1,6 \times 10^9$ UFC/grama de fezes; logo, o número de células viáveis encontrado, neste experimento, está muito próximo dos encontrados por esses autores.

Várias colônias foram isoladas e transferidas para tubos contendo caldo MRS enriquecido com 0,15% de sais biliares. GILLILAND e SPECK (1977) testaram concentrações de 0,05; 0,10; e 0,15% de “Oxgall” (sais biliares) em meio seletivo para lactobacilos resistentes a sais biliares. Das culturas examinadas, o *Lactobacillus bulgaricus* e o *Lactobacillus lactis* foram os mais sensíveis, não crescendo em meio contendo 0,15% de sais biliares. Todas as estirpes de *Lactobacillus acidophilus* cresceram bem nas diferentes concentrações de sais biliares. Resultados similares foram observados com *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*. Existe relação positiva entre a resistência a sais biliares e a capacidade do microrganismo em colonizar o trato intestinal.

Após 48 horas de incubação a 37°C, as culturas com crescimento evidenciado foram plaqueadas por estrias no meio Rogosa SL e incubadas, também, sob baixo teor de oxigênio, a 37°C por 48 horas, para posterior reisolamento. Novamente, várias colônias foram transferidas para tubos contendo LDR-12% ESD esterilizado, sendo incubadas a 37°C até coagulação. O *Lactobacillus acidophilus* oxida a lactose do leite, até ácido láctico, reduzindo o pH e coagulando o leite (KANDLER e WEISS, 1986). Descartando as culturas que não coagularam o leite, obtiveram-se 526 culturas, com média de 32,88 isolados por bezerro.

Dos 526 isolados submetidos ao teste de gram e morfologia celular, 154 (29,3%) apresentaram-se como bastonetes gram-positivos - característica própria do *Lactobacillus acidophilus* (KANDLER e WEISS, 1986). Ocorreram variações, consideradas normais na morfologia destes isolados, mas CRUICKSHANK (1960) e KANDLER e WEISS (1986) relataram que há variações morfológicas entre estirpes de *Lactobacillus acidophilus*.

Dos 154 isolados, bastonetes gram-positivos, 152 (98,7%) mostraram-se negativos ao teste da catalase. Bactérias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) são catalase-negativas (ROGOSA, 1974).

Foram submetidos ao teste de produção de gás a partir da glicose 152 isolados, dos quais sete (4,6%) produziram gás, sendo, portanto, positivos ao teste. Segundo KANDLER e WEISS (1986), as estirpes de *Lactobacillus acidophilus* são homofermentativas e a via principal de fermentação das hexoses é a Embden-Meyerhof, convertendo 1 mol de hexose em 2 moles de ácido láctico.

Constatou-se que, entre os 145 isolados, até então

bastonetes gram-positivos, catalase-negativos e não produtores de gás a partir da glicose, após submetidos aos testes de coagulação do leite a 15 e 45°C, redução do “Litmus milk”, crescimento em 4 e 8% de cloreto de sódio, hidrólise da arginina, redução do nitrato e fermentação de diferentes “carboidratos”, 18 (12,4%) cresceram e coagularam o leite a 15°C por 30 dias e 31 (21,4%) não cresceram a 45°C por 72 horas; conseqüentemente, 100 (69%) isolados não cresceram a 15°C por 30 dias, e sim a 45°C por 72 horas. Segundo KANDLER e WEISS (1986), com raras exceções, o *Lactobacillus acidophilus* apresenta bom crescimento a 45°C. Orla-Jensem (1919), citado por SHARPE (1962), classifica o *Lactobacillus acidophilus* no grupo das termobactérias, que crescem a 45°C, e não a 15°C.

No teste de redução do “Litmus milk”, cinco (3,4%) não reduziram o meio, mas o *Lactobacillus acidophilus* reduz o “Litmus milk”. SKERMAN (1959) cita que esta é uma das características apresentadas por microrganismos homofermentativos com temperatura ótima de crescimento igual ou superior a 37°C.

Quanto ao crescimento em 4 e 8% de cloreto de sódio, 102 (70,3%) cresceram e 96 (66,2%) não cresceram, respectivamente, nas concentrações de 4 e 8% de NaCl. DAVIS (1955) dividiu os lactobacilos em quatro grupos; o *Lactobacillus acidophilus* pertence ao grupo capaz de crescer em meio com 4, e não 8% de cloreto de sódio.

Todos os isolados testados (145) apresentaram resultados negativos à hidrólise de arginina, que são compatíveis com os obtidos por PAULO (1991), em caracterização de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de fezes de

suínos. Segundo KANDLER e WEISS (1986), o *Lactobacillus acidophilus* não produz amônia a partir da arginina, sendo, portanto, negativo ao teste.

Todos os 145 isolados testados também apresentaram resultados negativos no teste de redução do nitrato. Segundo KANDLER e WEISS (1986), a redução do nitrato por lactobacilos é altamente incomum.

Dos 145 isolados testados, 68 (46,9%) não cresceram a 15°C, mas a 45°C; reduziram o “Litmus milk”; não cresceram em presença de 8% de cloreto de sódio; não produziram amônia a partir da arginina; e não reduziram o nitrato. Nos testes com cloreto de sódio (4%), admitem-se resultados variáveis. Estes 68 isolados com características compatíveis com *Lactobacillus acidophilus* deram continuidade aos testes de caracterização, sendo desta vez submetidos aos testes de fermentação de “carboidratos”, conforme Tabela 1.

Vinte e três isolados (33,8%) apresentaram características próprias do *Lactobacillus acidophilus* com relação à fermentação de “carboidratos” (KANDLER e WEISS, 1986), os quais foram posteriormente submetidos ao teste API. Na Tabela 2 constam os “carboidratos” do teste API e nas Tabelas 3 e 4, as características do *Lactobacillus acidophilus*.

Dos 23 isolados, 12 (52,2%) mantiveram os resultados compatíveis às características do *Lactobacillus acidophilus* (LT 154A; LT 156B; LT 158A; LT 350; LT 360; LT 361; LT 482; LT 484; LT 510; LT 516; LT 518; e LT 520).

Alguns isolados não apresentaram os resultados esperados para:

a) Amigdalina: os isolados LT 154A; LT 156B; LT

Tabela 1 - Fermentação de “carboidratos” para caracterização dos isolados

Table 1 - Carbohydrate fermentation to characterize the isolates

N ^o dos isolados N. of isolates	Ar	Cel	Esc	Fru	Gal	Gli	Ma	Mal	Man	Sac	Sal	Sor	Xil
LT11B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT11C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT12A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT12B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT12C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT15A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT23C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT27A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT27B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT27C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT28A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT29B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT29C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT37	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT98	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT146	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

continua na página seguinte...

N ^o dos isolados	Ar	Cel	Esc	Fru	Gal	Gli	Ma	Mal	Man	Sac	Sal	Sor	Xil
<i>N. of isolates</i>													
LT154A*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT155	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT156B*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT158A*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT166B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT169B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT172B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT177B	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
LT179	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT305	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
LT309A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT311	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT317A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT317B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT340	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LT344	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT346*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT347*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT350*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT351*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT352	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT360*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT361*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT364	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
LT365	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT375	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
LT380	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
LT391	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT392	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT394	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT395	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT402	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT481*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT482*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
LT484*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT486*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT510*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT511*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT512*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT513	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LT514	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LT515*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT516*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT517	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT518*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT520*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT521*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT522	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT523*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT524	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT525*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT526	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Comercial	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
#	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)	-

→ KANDLER e WEISS (1986).

(+) → Resultados variáveis.

Comercial → *Lactobacillus acidophilus* comercial.

* → Característica do *Lactobacillus acidophilus*. "Carboidratos": arabinose (Ar), celobiose (Cel), esculina (Esc), frutose (Fru) galactose (Gal), glicose (Gli), manitol (Ma), maltose (Mal), manose (Man), sacarose (Sac), salicina (Sal), sorbitol (Sor) e xilose (Xil).

(+) → Variable results.

Comercial → Commercial *Lactobacillus acidophilus*.

* → Characteristic of *Lactobacillus acidophilus*. "Carbohydrates": arabinose (Ar), celobiose (Cel), esculine (Esc), fructose (Fru), galactose (Gal), glucose (Gli), manitol (Ma), maltose (Mal), manose (Man), sucrose (Sac), salicine (Sal), sorbitol (Sor) and xylose (Xil).

158A; LT 360; LT 361; LT 482; LT 484; LT 510; LT 516; LT 518; e LT 520 apresentaram resultados variáveis. Os resultados positivos variaram de 1 a 67% (Tabela 4).

b) Arbutina: os isolados LT 154A; LT 156B; LT 361; LT 484; e LT 510 apresentaram resultados positivos e os isolados LT 350; LT 360; LT 516; LT 518; e LT 520, resultados variáveis. Os resultados positivos para o teste API variaram de 1 a 67%.

c) Esculina: todos os isolados apresentaram re-

sultados negativos no teste; contudo, como pode ser observado na Tabela 4, os resultados positivos variaram de 36 a 99% para as estirpes de *Lactobacillus acidophilus* testados.

d) β -gentiobiose: os isolados LT 158A; LT 360; LT 484; LT 510; e LT 518 apresentaram resultados negativos e os isolados LT 154A; LT 156B; LT 350; LT 361; LT 482; LT 516; e LT 520, resultados variáveis. Os testes positivos variaram de 4 a 99%.

Tabela 2 - "Carboidratos" incluídos no teste rápido de carboidratos (teste API)

Table 2 - Carbohydrates included in the rapid carbohydrate test (API test)

Faixa Stripe				
1	2	3	4	5
0- Controle	10- Galactose	20- α -metil-D- manosidese	30- Melibiose	40- D-turanose
1- Glicerol	11- D-Glicose	21- α -metil-D-glicositose	31- Sacarose	41- D-lixose
2- Eritrol	12- D-Frutose	22- N-acetil-glicosamina	32- Trealose	42- D-tagatose
3- D-arabinose	13- D-Manose	23- Amigdalina	33- Inulina	43- D-fucose
4- L-arabinose	14- L-Sorbose	24- Arbutina	34- Melezitose	44- L-fucose
5- Ribose	15- Rannose	25- Esculina	35- D-rafinose	45- D-arabitol
6- D-xilose	16- Dulcitol	26- Salicina	36- Amido	46- L-arabitol
7- L-xilose	17- Inositol	27- Celobiose	37- Glicogênio	47- Gluconato
8- Adonitol	18- Manitol	28- Maltose	38- Xilitol	48- 2-ceto- gluconato
9- β -metil-D-xilosidade	19- Sorbitol	29- Lactose	39- β -gentiobiose	49- α -ceto-gluconato

Fonte \rightarrow fornecido pelo fabricante dos materiais usados para o teste ("Analytab products - New York").

Source \rightarrow specified by the producers of the material used in the tests ("Analytab products - New York").

Tabela 3 - Características da estirpe *Lactobacillus acidophilus* ATCC no teste API

Table 3 - Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* ATCC in the API Test

Faixa Stripe																								
1					2					3					4					5				
Horas de incubação					Horas de incubação					Horas de incubação					Horas de incubação					Horas de incubação				
Incubation time					Incubation time					Incubation time					Incubation time					Incubation time				
C	3	6	24	48	C	3	6	24	48	C	3	6	24	48	C	3	6	24	48	C	3	6	24	48
0					10					20					30					40				
1					11					21					31					41				
2					12					22					32					42				
3					13					23					33					43				
4					14					24					34					44				
5					15					25					35					45				
6					16					26					36					46				
7					17					27					37					47				
8					18					28					38					48				
9					19					29					39					49				

C \rightarrow Carboidrato segundo Tabela 2.

1 a 5 \rightarrow Grau de reação.

Fonte \rightarrow Fornecido pelo fabricante dos materiais usados para o teste ("Analytab products - New York").

C \rightarrow Carbohydrate according to Table 2.

1 to 5 \rightarrow Degree of reaction.

Source \rightarrow Specified by the producers of the material used in the tests ("Analytab products - New York").

Tabela 4 - Percentual de resultados positivos, após incubação a 37°C por 48 horas, de três estirpes de *Lactobacillus acidophilus* testadas frente ao teste APITable 4 - Percent of positive results, after incubation at 37°C for 48 hours, of three *Lactobacillus acidophilus* strains tested in the API test

Faixa																			
Stripe																			
1				2				3				4				5			
Estirpe				Estirpe				Estirpe				Estirpe				Estirpe			
Strain				Strain				Strain				Strain				Strain			
C	L.1	L.2	L.3	C	L.1	L.2	L.3	C	L.1	L.2	L.3	C	L.1	L.2	L.3	C	L.1	L.2	L.3
0				10	75	99	71	20				30	4	1	1	40	4	1	1
1				11	100	100	100	21				31	100	100	100	41			
2				12	100	100	100	22	79	99	75	32	77	1	43	42	46	20	1
3				13	96	99	64	23	67	20	1	33	1	20	1	43			
4	4	1	1	14				24	67	1	1	34				44			
5				15				25	99	99	36	35	25	80	21	45			
6				16				26	85	40	29	36	21	80	9	46			
7				17				27	96	80	71	37	1	20	1	47			
8				18	4	40	1	28	83	99	75	38				48			
9				19				29	73	99	64	39	99	99	4	49			

C → Carboidrato segundo Tabela 2.

L.1; L.2; L.3 → *Lactobacillus acidophilus* comerciais.

1 a 100 → Percentuais de reações positivas.

Fonte → Prospecto fornecido pela "Bio Mérieux" França.

C → Carbohydrate according to Table 2.

L.1; L.2; L.3 → Commercial *Lactobacillus acidophilus*.

1 a 100 → Percents of positive reactions.

Source → "Bio Mérieux" France, booklet.

Conclusões

De um total de 526 "isolados" iniciais de fezes de bezerros, obtiveram-se 12 (2,28%) estirpes (LT 154A; LT 156B; LT 158A; LT 350; LT 360; LT 361; LT 482; LT 484; LT 510; LT 516; LT 518; e LT 520) de *Lactobacillus acidophilus*.

Referências Bibliográficas

- BIER, O. 1985. Lactobacilos. In: *Microbiologia e imunologia*. 24. ed. São Paulo: Edições Melhoramentos. 1234p.
- COLLINS C. H. 1969. *Métodos Microbiológicos*. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha. 238p.
- COLLINS, E.B., HARTLEIN, K. 1982. Influences of temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks. *J. Dairy Sci.*, 65:883-886.
- COWAN, S.T., STEEL, J.K. 1965. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. 217p.
- CRUICKSHANK, R. 1960. *Mackie and McCartney's handbook of bacteriology*. 10. ed. E & S. Edinburgh, Livingstone Limited. 979p.
- DAVIS, G.H. 1955. The classification of lactobacilli from the human mouth. *J. General Microb.*, 13:481-493.
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Applied Bact.*, 23:130-135.
- GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. 1977. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. *J. Dairy Sci.*, 60:1394-1398.
- GILLILAND, S.E., SPECK, M.L., MORGAN, C. G. 1975. Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans, pigs and chickens. *Appl. Envir. Microb.*, 30:541-545.
- KANDLER, O., WEISS, N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. p.1208-1234.
- MICOLAJCIK, E. M. 1964. Single broth for the differentiation of *Streptococcus lactis* from *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 47:437- 438.
- NORRIS, J. R., RIBBONS, D. W. 1971. *Methods in microbiology*. London Academia Press. 234p.
- PAULO, E.M. *Isolamento e caracterização de Lactobacillus acidophilus de fezes de suínos para uso como probiótico*. Viçosa, MG: UFV, 1991. 73p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- PELCZAR, M. J., REID, R., CHAN, E. C. S. 1981. *Microbiologia*. São Paulo: Ed. Mcgraw. Hill do Brasil. 1072p.
- ROGOSA, M. 1974. Gram-positive, asporogenous, rod-shaped bacteria. In: BUCHANAN, R. E. (Ed.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co. p.576-593.
- SANTOS, N.S. *Isolamento e caracterização de Lactobacillus acidophilus de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético*. Viçosa: UFV, 1984. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- SHARPE, M.E. 1962. Taxonomy of the lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 24:109-118.
- SKERMAN, V.B.D. 1959. *A guide to the identification of the general of bacteria*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 217p.
- SPECK, M.L. 1984. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 2.ed., Washington, DC. p.409.

Recebido em: 04/12/97

Aceito em: 25/03/99