

## Seleção de Isolados de *Lactobacillus acidophilus* Usados como Probiótico em Bezerros<sup>1</sup>

Antônio Hamilton Chaves<sup>2</sup>, José Fernando Coelho da Silva<sup>3</sup>, Adão José Rezende Pinheiro<sup>4</sup>,  
Sebastião de Campos Valadares Filho<sup>3</sup>, Oriel Fajardo de Campos<sup>5</sup>

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes *Lactobacillus acidophilus* para serem usadas como probiótico em bezerros. Estirpes de *Lactobacillus acidophilus* (12) foram isoladas de amostras de fezes de bezerros e selecionadas quanto às suas capacidades acidificantes, à resistência a vários antibióticos usados na criação de bezerros, ácido clorídrico, lisozima, fenol e sais biliares, à capacidade de crescimento em líquido ruminal e à capacidade antagonista *in vitro* a uma estirpe enteropatogênica de *Escherichia coli*. Os isolados foram classificados como lentos na produção de ácido láctico. Nos testes de resistência ao ácido clorídrico (pH 2,0 e 3,0), à lisozima, ao fenol, aos sais biliares, aos antibióticos testados e ao líquido ruminal, os isolados LT 158A e LT 516 comportaram de acordo com a média dos outros isolados. No teste de antagonismo à estirpe de *Escherichia coli*, os isolados LT 158A e LT 516 foram muito eficientes, produzindo um halo de 18-mm de diâmetro. Os isolados LT 158A e LT 516 mostraram o melhor desempenho para serem usados como probiótico em bezerros.

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

## Selection of Isolates of *Lactobacillus acidophilus* Used as Probiotic for Calves

**ABSTRACT** - The objective of this work was to select strains of *Lactobacillus acidophilus* to be used as a probiotic in calves. Strains of *Lactobacillus acidophilus* (12) were isolated from calves feces and selected according to their acidifying capacities, resistance to hydrochloridric acid, lysozyme, phenol, biliary salt, antibiotics used in the calves productions, capacities of growing in ruminal liquid, and their capacities to inhibit a strain of enteropathogenic *Escherichia coli in vitro*. The isolates were classed as slower in lactic acid production. In test of resistance to hydrochloridria acid (pH 2.0 and 3.0), lysozyme, phenol and biliary salt, tested antibiotics and ruminal liquid, the isolates LT 158A and LT 516 behaved in accordance with the means of the other isolates. In the inhibition test with *Escherichia coli*, the isolates LT 158A and LT 516 were very efficient, producing an 18-mm halo of diameter. The isolates LT 158A and LT 516 showed the best performance to be used as probiotics for calves.

Key Words: calf, *Lactobacillus acidophilus*, probiotic

### Introdução

Bactérias usadas como probiótico, para atuarem no intestino delgado, devem apresentar certas qualidades básicas: 1) ser habitante normal do intestino do hospedeiro ou ter a capacidade de se adaptar ao ambiente intestinal; 2) sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e ser capaz de se implantar, particularmente, no intestino delgado; 3) realizar funções que sejam vantajosas para o hospedeiro; e 4) não deve prejudicar a qualidade do alimento usado como carreador, do mesmo modo que o alimento ou o seu processamento não devem prejudicar a cultura (SHAHANI e CHANDAN, 1979).

Sendo a passagem do microrganismo pelo trato

gastrointestinal e sua capacidade de sobrevivência e multiplicação no intestino delgado um fator de grande relevância, é de suma importância que sejam testados antes de usá-los como probióticos, principalmente em relação à lisozima, ao ácido clorídrico, ao fenol, aos sais biliares e até ao líquido ruminal. O *Lactobacillus acidophilus*, além de produzir substâncias antimicrobianas conhecidas como bacteriocinas, produz ácido láctico, que exerce atividade antimicrobiana sobre os microrganismos causadores de toxi-infecções, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e *Escherichia coli* enteropatogênica.

É também necessário testá-los frente aos antibióticos mais usados para bezerros, objetivando-se, caso seja preciso, o fornecimento de *Lactobacillus*

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Professor da Escola Agrotécnica Federal de Uberaba, Uberaba-MG.

<sup>3</sup> Professor do DZO, UFV, Viçosa, MG, Bolsistas do CNPq.

<sup>4</sup> Professor do DTA, UFV, Viçosa, MG, Bolsista do CNPq.

<sup>5</sup> Pesquisador da EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, MG.

*acidophilus* e antibióticos ao mesmo tempo.

Outro fator importante na seleção é testar estes isolados frente a microrganismos causadores de diarreias.

Pela importância da seleção *in vitro* dos isolados, os objetivos do presente trabalho foram determinar a produção de ácido láctico e a concentração hidrogeniônica; avaliar as resistências de 12 isolados de *Lactobacillus acidophilus* ao ácido clorídrico, à lisoizima, ao fenol, a sais biliares e ao líquido ruminal; testar as resistências destes isolados frente a diversos antibióticos; e avaliar suas capacidades antagônicas frente a uma estirpe de *Escherichia coli* enteropatogênica.

### Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Avaliou-se a capacidade acidificante dos 12 isolados (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), inoculando-se estas culturas a 1% em leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% de extrato seco desengordurado (ESD), previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, determinaram-se a acidez (°Dornic) e o pH nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 36 e 48 horas de incubação a 37°C.

No teste de resistência ao ácido clorídrico, o pH do LDR (10% ESD) foi reduzido a 2,0 e 3,0 com solução diluída de ácido clorídrico estéril. Os isolados previamente ativados em LDR (10% ESD) foram inoculados (1%) e incubados a 37°C. As amostras foram coletadas com 0, 1, 2 e 3 horas de exposição ao LDR acidificado. Após neutralização com solução (0,1N) de hidróxido de sódio esterilizada, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) em agar DE MAN, ROGOSA e SHARPE (MRS), desenvolvido por DE MAN et al. (1960).

No estudo de resistência à lisoizima, a lisoizima da clara de ovo (mucopeptídeo N-acetilmuramoil hidrolase, Sigma grade, 42000 Unit./mg) foi diluída em tampão fosfato (pH 6,2) na concentração de 80 mg/100 mL (AGOSTINHO, 1988). As culturas de *Lactobacillus acidophilus* foram crescidas em caldo MRS a 37°C. Após atingirem a fase estacionária (aproximadamente 18 horas de incubação), foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em tampão fosfato 0,067M (pH 6,2). As suspensões de células foram adicionadas ao preparado enzimático na pro-

porção de 1:1, seguido de incubação a 37°C. As taxas de clareamento das suspensões foram determinadas por meio da transmitância a 540nm, medidas em Spectrofotômetro Spectronic 20 no momento da mistura (tempo zero) e após 1 e 2 horas de exposição à lisoizima. A diferença entre os valores da transmitância final e inicial, dividida pelo tempo de contato, em minutos, foi considerada como medida da suscetibilidade das células (VAKIL et al., 1969).

Caldo MRS adicionado de fenol nas concentrações de 0; 0,2; 0,3; 0,4; e 0,5% e esterilizado a 121°C por 15 minutos foi inoculado (1%) com os isolados teste e incubados a 37°C; as sobrevivências ou crescimentos destes isolados foram observados ou monitorados por meio da absorbância a 620 nm, medidas em Spectrofotômetro Spectronic 20, no momento da incubação e após 24 e 48 horas de exposição ao fenol (DAVIS, 1955).

Para o teste de resistência a sais biliares, os isolados de *Lactobacillus acidophilus*, previamente ativados em MRS, foram inoculados (1%) no caldo MRS, contendo diferentes concentrações de sais biliares (Oxgall-Merck): 0; 0,3; e 0,5%. Após incubação a 37°C, a sobrevivência ou crescimento das culturas de isolados frente aos sais biliares foi monitorada pela absorbância (620 nm) em espectrofotômetro Spectronic 20, no momento da inoculação e a cada hora, pelo período de 8,0 horas de incubação (FLOCH et al., 1970; GILLILAND et al., 1985; e NOH e GILLILAND, 1993).

Para a avaliação do crescimento em líquido ruminal, os isolados foram inoculados (1%) em líquido ruminal natural (sem esterilização) e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após incubação a 37°C, avaliaram-se as capacidades de crescimento por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), em meio seletivo agar Rogosa SL, desenvolvido por Rogosa (KANDLER e WEISS, 1986), nos tempos 0, 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.

Utilizou-se o método da difusão em placas com discos impregnados com antibióticos (antibiograma), para o teste de sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos, cujas concentrações e limites de diâmetro dos halos de inibição encontram-se na Tabela 1 (WISTREICH e LECHTMAN, 1976; NCCLS, 1983). A incubação foi realizada a 37°C por 48 horas.

Os isolados foram testados quanto a suas capacidades antagônicas a uma estirpe de *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de fezes de bezerro com diarreia, do laboratório de Medicina Preventiva da Clínica Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1 - Diâmetro de halos de inibição (mm), determinantes da resistência (R), intermediação (I) ou sensibilidade (S), segundo o antibiótico e sua concentração

Table 1 - Diameter of inhibition halos (mm), indicating resistance (R), intermediation (I) or sensibility (S), according to antibiotics and its concentration

Antibiótico <i>Antibiotic</i>	Concentração (mcg) <i>Concentration</i>	Halo de inibição (mm) <i>Inhibition halo</i>		
		R	I	S
Sulfazotrim	25	≤ 10	11-15	≥ 16
Gentamicina <i>Gentamicine</i>	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Cefalotina <i>Cefalotine</i>	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Kanamicina <i>Kanamicine</i>	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Amicacina <i>Amicacine</i>	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Cloranfenicol <i>Chloranfenicol</i>	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Carbenicilina <i>Carbenicilin</i>	100	≤ 17	18-22	≥ 23
Ampicilina <i>Ampicilin</i>	10	≤ 11	12-13	≥ 14
Cefoxitina <i>Cefoxitin</i>	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Tetraciclina <i>Tetraciclina</i>	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Cefazolina <i>Cefazolin</i>	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima <i>Cefotaxim</i>	30	≤ 14	15-22	≥ 23

Fonte ® Fabricante dos discos impregnados com antibióticos (CECON).

Source ® Industry producing antibiotics impregnated discs (CECON).

sa (UFV). Os testes foram realizados nos mesmos moldes dos testes de resistência a antibióticos (antibiograma), visto que desta vez a *Escherichia coli* foi semeada na superfície do agar MRS e os discos (8 mm de diâmetro) foram impregnados com o caldo MRS contendo os isolados de *Lactobacillus acidophilus*. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e a determinação da inibição realizada de acordo com SANTOS (1984), que considerou como inibição muito forte as zonas de 20 a 25 mm de diâmetro; inibição forte, de 15 a 19 mm, moderada, de 11 a 14 mm; fraca, de 9 a 10 mm; e nenhuma inibição, menor que 9 mm.

### Resultados e Discussão

O percentual de ácido lático produzido pelos diferentes isolados variou de 1,41 a 1,71% com 48 horas de incubação (Tabela 2), uma vez que com 21 horas esta variação foi de 0,73 a 0,83%.

A atividade antimicrobiana do *Lactobacillus acidophilus* em diferentes bactérias é atribuída, em grande parte, à produção de ácido lático (HAMDAN

e MIKOLAJCIK, 1974; STAMER, 1979). Em trabalho semelhante, SANTOS (1984), trabalhando com três estirpes de *Lactobacillus acidophilus* isoladas de fezes de bezerros, encontrou com 21 horas de incubação variação no percentual de ácido lático produzido de 0,53 a 0,68%. PAULO (1991), trabalhando com sete estirpes de *Lactobacillus acidophilus* isoladas de material fecal de suínos, encontrou com 24 horas de incubação variação no percentual de ácido lático de 0,37 a 0,80%.

SPECK (1962) relatou que estirpes produzindo de 0,8 a 1,0% de ácido lático, com 24 horas de incubação são consideradas lentas. Esse autor, em 1978, relatou ser estas estirpes as mais indicadas para serem utilizadas como probiótico.

O pH variou de 3,72 a 3,54 e 5,26 a 4,77, respectivamente, em 48 e 21 horas de incubação (Tabela 3). PAULO (1991), trabalhando com sete estirpes de *Lactobacillus acidophilus* isoladas de material fecal de suínos, encontrou com 48 horas de incubação variação no pH de 5,36 a 3,99.

A média de sobrevivência (Tabelas 4 e 5) após

Tabela 2 - Média de acidez titulável (% ácido láctico) dos isolados de *Lactobacillus acidophilus* em LDR (10% ESD), com diferentes tempos de incubação a 37°CTable 2 - Mean of titrable acidity (% of lactic acid) from isolates of *Lactobacillus acidophilus* in LDR (10% ESD), with different incubation times at 37°C

Isolado <i>Isolate</i>	Tempo de incubação (h) <i>Incubation time</i>												
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	36	48
LT154A	0,32	0,32	0,35	0,41	0,45	0,51	0,62	0,78	0,94	1,12	1,31	1,36	1,71
LT156B	0,32	0,32	0,37	0,42	0,46	0,50	0,57	0,76	0,90	1,14	1,23	1,34	1,65
LT158A	0,31	0,32	0,36	0,42	0,44	0,53	0,57	0,74	0,89	1,06	1,14	1,23	1,61
LT350	0,31	0,31	0,38	0,44	0,48	0,54	0,63	0,74	0,89	1,08	1,17	1,21	1,59
LT360	0,32	0,33	0,38	0,43	0,48	0,59	0,66	0,76	0,87	1,08	1,17	1,24	1,64
LT361	0,33	0,33	0,37	0,40	0,46	0,56	0,66	0,76	0,84	0,96	1,10	1,19	1,58
LT482	0,32	0,33	0,36	0,40	0,45	0,55	0,66	0,73	0,85	0,97	1,07	1,14	1,56
LT484	0,31	0,33	0,36	0,43	0,46	0,51	0,54	0,74	0,81	0,89	0,94	0,98	1,41
LT510	0,33	0,34	0,36	0,45	0,48	0,51	0,62	0,77	0,80	0,90	0,98	1,05	1,52
LT516	0,33	0,33	0,35	0,42	0,48	0,55	0,63	0,73	0,84	0,95	1,03	1,14	1,48
LT518	0,33	0,34	0,36	0,39	0,47	0,53	0,59	0,83	0,88	1,07	1,23	1,31	1,53
LT520	0,32	0,33	0,36	0,42	0,45	0,54	0,57	0,73	0,82	0,91	1,06	1,17	1,55

Tabela 3 - Média dos valores de pH dos isolados de *Lactobacillus acidophilus*, em LDR, (10% ESD) com diferentes tempos de incubação a 37°CTable 3 - Mean pH values from isolates of *Lactobacillus acidophilus*, in LDR (10% ESD), with different incubation times at 37°C

Isolado <i>Isolate</i>	Tempo de incubação (h) <i>Incubation time</i>												
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	36	48
LT154A	6,11	6,09	5,79	5,68	5,53	5,45	5,27	4,77	4,60	4,37	4,20	4,00	3,55
LT156B	6,13	6,11	5,81	5,68	5,56	5,40	5,36	4,93	4,58	4,32	4,26	4,01	3,54
LT158A	6,13	6,10	5,77	5,65	5,53	5,34	5,32	4,78	4,53	4,28	4,23	4,04	3,58
LT350	6,09	6,08	5,77	5,67	5,45	5,33	5,26	4,91	4,57	4,34	4,26	4,10	3,59
LT360	6,07	6,00	5,76	5,60	5,44	5,28	5,27	4,93	4,58	4,34	4,31	4,12	3,66
LT361	6,09	6,06	5,77	5,63	5,47	5,40	5,33	5,01	4,68	4,41	4,37	4,20	3,71
LT482	6,08	6,08	5,89	5,78	5,64	5,45	5,40	5,07	4,68	4,40	4,37	4,22	3,65
LT484	6,06	6,05	5,87	5,73	5,57	5,44	5,33	5,21	4,80	4,53	4,39	4,38	3,66
LT510	6,05	6,05	5,88	5,63	5,52	5,41	5,37	5,26	4,72	4,46	4,44	4,25	3,72
LT516	6,06	6,05	5,89	5,75	5,58	5,44	5,34	5,19	4,74	4,46	4,39	4,17	3,66
LT518	6,11	6,11	5,91	5,76	5,62	5,42	5,19	4,92	4,66	4,37	4,24	4,09	3,62
LT520	6,11	6,10	5,92	5,80	5,63	5,40	5,27	5,05	4,71	4,56	4,38	4,09	3,64

uma hora de exposição a pH 2,0 foi de apenas 0,53%, enquanto em pH 3,0 obtiveram-se 55,61; 26,14; e 11,70% com 1, 2 e 3 horas de exposição ao ácido clorídrico, respectivamente. Com 11,70% de sobrevivência, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi de  $6,67 \times 10^7$  por mL. Segundo GILLILAND et al. (1978),  $10^6$  UFC por mL de *Lactobacillus acidophilus* são suficientes para que ocorra o mecanismo competitivo com os patógenos, assegurando sua implantação em nível de trato gastrointestinal.

Todos os isolados apresentaram taxas de lises (Tabela 6) bem inferiores à do *Micrococcus lysodeikticus* (microrganismo usado como controle

de lise), que foi de 0,63% de transmitância/minuto para a lisozima do ovo e 1,82% para a lisozima do leite bovino. VAKIL et al. (1969), trabalhando com diversos microrganismos em testes de resistência à lisozima do leite bovino, constataram que o *Lactobacillus casei* é um dos menos sensíveis a esta lisozima. Os resultados da Tabela 6 são compatíveis com os encontrados por AGOSTINHO (1988). Já CHASSY e GIUFFRIDA (1980) reportaram que os lactobacilos são mais resistentes à lisozima que os estreptococos; esta menor sensibilidade se deve à maior espessura e densidade da parede celular dos lactobacilos. Segundo VAKIL et al. (1969), a lisozima promove lise de

Tabela 4 - Média das contagens de UFC, para as diversas culturas de isolados de *Lactobacillus acidophilus*, e percentuais das médias destas UFC presentes no meio de cultura (pH = 2,0) com ácido clorídrico, incubadas a 37°C

Table 4 - Mean of colony formation unit (UFC), for the several isolates cultures of *Lactobacillus acidophilus* and mean percentages of UFC present in culture medium (pH = 2.0) with hydrochloric acid, for different incubation times at 37°C

Isolado Isolate	Tempo de incubação (h) Incubation time			
	0	1	2	3
	----- UFC/mL -----			
LT154A	3,35 x 10 <sup>8</sup>	3,26 x 10 <sup>5</sup>	1,20 x 10 <sup>4</sup>	3,25 x 10 <sup>3</sup>
LT156B	7,84 x 10 <sup>8</sup>	4,00 x 10 <sup>6</sup>	7,33 x 10 <sup>5</sup>	3,40 x 10 <sup>4</sup>
LT158A	2,46 x 10 <sup>8</sup>	2,93 x 10 <sup>4</sup>	9,50 x 10 <sup>3</sup>	7,50 x 10 <sup>2</sup>
LT350	9,91 x 10 <sup>8</sup>	3,00 x 10 <sup>6</sup>	6,23 x 10 <sup>4</sup>	1,00 x 10 <sup>3</sup>
LT360	7,61 x 10 <sup>8</sup>	3,00 x 10 <sup>6</sup>	1,92 x 10 <sup>5</sup>	7,50 x 10 <sup>2</sup>
LT361	1,00 x 10 <sup>9</sup>	3,50 x 10 <sup>6</sup>	6,11 x 10 <sup>5</sup>	1,08 x 10 <sup>5</sup>
LT482	4,18 x 10 <sup>8</sup>	3,66 x 10 <sup>6</sup>	4,98 x 10 <sup>5</sup>	1,63 x 10 <sup>4</sup>
LT484	5,48 x 10 <sup>8</sup>	4,01 x 10 <sup>6</sup>	1,15 x 10 <sup>6</sup>	5,25 x 10 <sup>3</sup>
LT510	4,40 x 10 <sup>8</sup>	4,02 x 10 <sup>6</sup>	1,17 x 10 <sup>5</sup>	6,50 x 10 <sup>3</sup>
LT516	2,06 x 10 <sup>8</sup>	2,80 x 10 <sup>5</sup>	6,00 x 10 <sup>3</sup>	5,00 x 10 <sup>3</sup>
LT518	5,72 x 10 <sup>8</sup>	4,79 x 10 <sup>6</sup>	2,16 x 10 <sup>6</sup>	4,98 x 10 <sup>5</sup>
LT520	7,51 x 10 <sup>8</sup>	4,00 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>4</sup>
Média	5,88 x 10 <sup>8</sup>	3,13 x 10 <sup>6</sup>	5,46 x 10 <sup>5</sup>	5,74 x 10 <sup>4</sup>
Mean				
Percentual	100	0,53	0,093	0,0098
Percentage				

Tabela 5 - Média das contagens de UFC, para as diversas culturas de isolados de *Lactobacillus acidophilus* e percentuais das médias destas UFC, presentes no meio de cultura (pH = 3,0) com ácido clorídrico, incubadas a 37°C

Table 5 - Mean of colony formation unit (UFC), for the several isolates cultures of *Lactobacillus acidophilus* and mean percentages of UFC present in culture medium (pH = 3.0) with hydrochloric acid, for different incubation times at 37°C

Isolado Isolate	Tempo de incubação (h) Incubation time			
	0	1	2	3
	----- UFC/mL -----			
LT154A	2,70 x 10 <sup>8</sup>	1,41 x 10 <sup>8</sup>	8,43 x 10 <sup>7</sup>	5,18 x 10 <sup>7</sup>
LT156B	9,63 x 10 <sup>8</sup>	5,61 x 10 <sup>8</sup>	1,17 x 10 <sup>8</sup>	2,95 x 10 <sup>7</sup>
LT158A	2,65 x 10 <sup>8</sup>	2,20 x 10 <sup>8</sup>	2,70 x 10 <sup>8</sup>	3,83 x 10 <sup>7</sup>
LT350	1,18 x 10 <sup>9</sup>	3,85 x 10 <sup>8</sup>	1,56 x 10 <sup>8</sup>	6,85 x 10 <sup>7</sup>
LT360	6,88 x 10 <sup>8</sup>	8,40 x 10 <sup>8</sup>	2,30 x 10 <sup>8</sup>	9,40 x 10 <sup>7</sup>
LT361	5,40 x 10 <sup>8</sup>	3,85 x 10 <sup>8</sup>	2,09 x 10 <sup>8</sup>	1,47 x 10 <sup>8</sup>
LT482	3,40 x 10 <sup>8</sup>	2,15 x 10 <sup>8</sup>	1,16 x 10 <sup>8</sup>	1,78 x 10 <sup>7</sup>
LT484	7,13 x 10 <sup>8</sup>	2,24 x 10 <sup>8</sup>	8,00 x 10 <sup>7</sup>	4,58 x 10 <sup>7</sup>
LT510	4,20 x 10 <sup>8</sup>	3,46 x 10 <sup>8</sup>	1,42 x 10 <sup>8</sup>	8,63 x 10 <sup>8</sup>
LT516	1,33 x 10 <sup>8</sup>	9,18 x 10 <sup>7</sup>	6,60 x 10 <sup>7</sup>	4,03 x 10 <sup>7</sup>
LT518	8,57 x 10 <sup>8</sup>	1,67 x 10 <sup>8</sup>	8,50 x 10 <sup>7</sup>	1,65 x 10 <sup>7</sup>
LT520	4,65 x 10 <sup>8</sup>	2,28 x 10 <sup>8</sup>	2,30 x 10 <sup>8</sup>	1,65 x 10 <sup>8</sup>
Média	5,70 x 10 <sup>8</sup>	3,17 x 10 <sup>8</sup>	1,49 x 10 <sup>8</sup>	6,67 x 10 <sup>7</sup>
Mean				
Percentual	100	55,61	26,14	11,70
Percentage				

Tabela 6 - Média das transmitâncias iniciais e finais para os tempos de 1 e 2 horas de incubação, com os respectivos cálculos de lise em % de transmitância por minuto (%T/min.), para as culturas dos isolados de *Lactobacillus acidophilus*, no teste de resistência à lisozima, incubadas a 37°C

Table 6 - Mean initial and final transmittances for 1 or 2 hours of incubation times, with the respective lyse calculations in % of transmittance per minute (%T/min), for the isolates of *Lactobacillus acidophilus* isolates, in lysozyme resistance test, incubated at 37°C

Isolado Isolate	% transmitância % transmittance		% T/min	
	Final - inicial Final - initial	Final - inicial Final - initial	1 hora	2 horas
	1 hora	2 horas		
LT 154 A	19 - 18	27 - 18	0,017*	0,075
LT 156 B	17 - 15	22 - 15	0,033	0,058
LT 158 A	15 - 12	41 - 12	0,050	0,242
LT 350	18 - 16	25 - 16	0,033	0,075
LT 360	22 - 20	32 - 20	0,033	0,100
LT 361	16 - 15	24 - 15	0,017	0,075
LT 482	16 - 13	28 - 13	0,050	0,125
LT 484	19 - 16	22 - 16	0,050	0,050
LT 510	18 - 17	33 - 17	0,017	0,133
LT 516	16 - 14	20 - 14	0,033	0,050
LT 518	14 - 13	21 - 13	0,017	0,067
LT 520	17 - 16	21 - 16	0,017	0,042

\* Taxa de lise do isolado LT 154A em 1 hora de exposição à lisozima.

\* Tax of lyse for isolate LT 154A in 1 hour of lysozyme exposure.

certas bactérias, por hidrolisar a  $\beta$ -ligação entre o ácido murâmico e a glicosamina dos glicopolissacarídeos das paredes celulares destas bactérias.

A concentração da lisozima no leite bovino pode variar de 0 a 260  $\mu$ g, com média de 13  $\mu$ g/100 mL (VAKIL et al., 1969). Por ser esta concentração muito abaixo da utilizada no teste com lisozima da clara do ovo, supõe-se que os isolados de *Lactobacillus acidophilus* não sofrerão danos significativos, quando o leite bovino for usado como veículo para sua administração.

Os isolados cresceram bem no meio com até 0,3% de fenol e, mesmo com 0,4 e 0,5%, alguns isolados ainda apresentaram algum crescimento (Tabela 7). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por PAULO (1991), que trabalhou com *Lactobacillus acidophilus* isolados de fezes de suínos. Segundo DAVIS (1955), todas as estirpes de *Lactobacillus acidophilus* crescem na presença de 0,3% de fenol.

Os isolados apresentaram diferentes resistências a sais biliares (Tabela 8) - os que não alcançaram com 8 horas de incubação, 0,3 de absorvância com 0,3% de sais biliares (oxgall-Merck), ficaram muito próximos disto. Segundo GILLILAND et al. (1985), isolados que atingem 0,3 de absorvância com 8 horas de incubação são considerados tolerantes a sais biliares.

Os resultados das Tabelas 9 e 10 indicam que o "líquido ruminal" não é bom meio, pelo menos "in vitro", para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, porém não causa efeitos deletérios graves sobre este microrganismo. A taxa de crescimento no líquido ruminal natural, após 12 horas de incubação, foi 17,77% e no líquido ruminal esterilizado, 83,33%. Após 24 horas de incubação, a taxa de sobrevivência para o líquido ruminal natural e estéril foi 56,21 e 56,79%, respectivamente.

Os isolados apresentaram diferença de sensibilidade frente aos diversos antibióticos (Tabela 11), portanto, análises destes resultados deverão ser feitas quando houver uso conjunto de alguns isolados e antibióticos; contudo, os antibióticos sulfazotrim, gentamicina, kanamicina, amicacina e cefoxitina podem ser usados associados a qualquer dos isolados de *Lactobacillus acidophilus* testados.

Os resultados (Tabela 12) indicam que quatro isolados apresentaram antagonismo considerado forte frente à estirpe de *Escherichia coli* enteropatogênica. Um isolado (H<sub>2</sub>B<sub>20</sub>) de *Lactobacillus acidophilus* foi testado por SANTOS (1984), sendo considerado causador de inibição moderada (13 mm) com 40 horas de incubação frente à *Escherichia coli* K 12.

Tabela 7 - Crescimento dos isolados em diferentes concentrações de fenol e incubação, por 48 horas, a 37°C

Table 7 - Growth of isolates in different phenol concentrations and incubated for 48 hours, at 37°C

Isolado <i>Isolate</i>	% de fenol <i>Phenol</i>				
	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5
LT 154 A	+	+	+	?	-
LT 156 B	+	+	+	?	?
LT 158 A	+	+	+	?	-
LT 350	+	+	+	?	-
LT 360	+	+	+	?	-
LT 361	+	+	+	?	-
LT 482	+	+	?	?	-
LT 484	+	+	+	?	-
LT 510	+	+	+	?	-
LT 516	+	+	+	?	?
LT 518	+	+	+	?	?
LT 520	+	+	+	?	-

+ → Crescimento (*growth*).? → Baixíssimo crescimento (*very slow growth*).→ Ausência de crescimento (*absence of growth*).

Tabela 8 - Período necessário (horas) para os isolados incubados a 37°C atingirem 0,3 de absorbância em caldo MRS contendo "oxgall"

Table 8 - Necessary period (hours) for the isolates incubated at 37°C to get .3% of absorbance in MRS liquid with 0, .3 and .5% of oxgall

Isolado <i>Isolate</i>	Concentração de "oxgall" (%) <i>Oxgall concentration</i>		
	0	0,3	0,5
LT 154A	4,18	7,50	-
LT 156B	3,47	-	-
LT 158A	3,82	7,67	-
LT 350	3,38	-	-
LT 360	3,62	7,17	-
LT 361	2,72	-	-
LT 482	3,37	7,40	-
LT 484	3,42	6,57	-
LT 510	3,29	-	-
LT 516	4,27	7,38	-
LT 518	3,15	6,25	-
LT 520	3,35	-	-

- → Não atingiram 0,3 de absorbância com 8,0 horas de incubação a 37°C.

7,50 → Tempo gasto para que o isolado LT 154A atingisse 0,3 de absorbância.

- → Did not get .3% of absorbance with 8.0 hours incubation at 37°C.

7.50 → Time spent for the isolate LT 154A to get .3 of absorbance.

Tabela 9 - Média de unidades formadoras de colônias (UFC), contagens de lactobacilos facultativos (principalmente isolados de *Lactobacillus acidophilus*) e percentuais das médias de UFC no líquido natural de rúmen, para os diferentes tempos de incubação a 37°CTable 9 - Mean of colony formation unit (UFC), of facultatives lactobacilli (mainly isolates of *Lactobacillus acidophilus*) and mean percentages of UFC in natural rumen liquor, for different incubation times at 37°C

Isolado <i>Isolate</i>	Tempo de incubação (h) <i>Incubation time</i>				
	0	3	6	12	24
	-----UFC/mL-----				
LT154A	1,06 x 10 <sup>7</sup>	1,42 x 10 <sup>7</sup>	1,99 x 10 <sup>7</sup>	5,09 x 10 <sup>6</sup>	3,12 x 10 <sup>6</sup>
LT156B	3,60 x 10 <sup>6</sup>	1,03 x 10 <sup>7</sup>	1,31 x 10 <sup>7</sup>	2,44 x 10 <sup>7</sup>	6,24 x 10 <sup>6</sup>
LT158A	1,38 x 10 <sup>7</sup>	5,93 x 10 <sup>7</sup>	3,33 x 10 <sup>7</sup>	1,26 x 10 <sup>7</sup>	7,91 x 10 <sup>6</sup>
LT350	8,58 x 10 <sup>6</sup>	1,72 x 10 <sup>7</sup>	2,04 x 10 <sup>7</sup>	3,20 x 10 <sup>7</sup>	1,45 x 10 <sup>7</sup>
LT360	4,22 x 10 <sup>6</sup>	4,21 x 10 <sup>6</sup>	1,10 x 10 <sup>7</sup>	1,03 x 10 <sup>7</sup>	2,46 x 10 <sup>6</sup>
LT361	1,17 x 10 <sup>7</sup>	2,08 x 10 <sup>7</sup>	1,28 x 10 <sup>7</sup>	8,75 x 10 <sup>6</sup>	4,00 x 10 <sup>6</sup>
LT482	2,12 x 10 <sup>6</sup>	4,33 x 10 <sup>6</sup>	7,25 x 10 <sup>6</sup>	5,92 x 10 <sup>6</sup>	4,03 x 10 <sup>6</sup>
LT484	8,03 x 10 <sup>6</sup>	6,93 x 10 <sup>6</sup>	5,72 x 10 <sup>6</sup>	3,12 x 10 <sup>6</sup>	2,30 x 10 <sup>6</sup>
LT510	1,04 x 10 <sup>7</sup>	6,55 x 10 <sup>6</sup>	1,00 x 10 <sup>7</sup>	6,58 x 10 <sup>6</sup>	8,13 x 10 <sup>6</sup>
LT516	1,79 x 10 <sup>7</sup>	1,92 x 10 <sup>7</sup>	9,33 x 10 <sup>6</sup>	5,95 x 10 <sup>6</sup>	3,32 x 10 <sup>6</sup>
LT518	5,68 x 10 <sup>6</sup>	5,05 x 10 <sup>6</sup>	9,98 x 10 <sup>6</sup>	4,50 x 10 <sup>6</sup>	2,44 x 10 <sup>6</sup>
LT520	1,54 x 10 <sup>7</sup>	1,13 x 10 <sup>7</sup>	1,46 x 10 <sup>7</sup>	1,33 x 10 <sup>7</sup>	4,54 x 10 <sup>6</sup>
Média	9,34 x 10 <sup>6</sup>	1,49 x 10 <sup>7</sup>	1,39 x 10 <sup>7</sup>	1,10 x 10 <sup>7</sup>	5,25 x 10 <sup>6</sup>
<i>Mean</i>					
Percentual	100	159,53	148,82	117,77	56,21
<i>Percentage</i>					

Tabela 10 - Média de unidades formadoras de colônias (UFC), de contagens de isolados de *Lactobacillus acidophilus* e percentuais das médias de UFC no líquido estéril de rúmen, para os diferentes tempos de incubação a 37°C

Table 10 - Mean of colony formation unit (UFC), of isolate countings of *Lactobacillus acidophilus* and mean percentages of UFC in sterile rumen liquor, for different incubation times at 37°C

Isolado <i>Isolate</i>	Tempo de incubação (h) <i>Incubation time</i>				
	0	3	6	12	24
	-----UFC/mL-----				
LT154A	4,23 x 10 <sup>6</sup>	6,31 x 10 <sup>6</sup>	1,18 x 10 <sup>7</sup>	3,04 x 10 <sup>7</sup>	3,30 x 10 <sup>6</sup>
LT156B	4,97 x 10 <sup>6</sup>	1,20 x 10 <sup>7</sup>	2,79 x 10 <sup>7</sup>	2,32 x 10 <sup>7</sup>	4,15 x 10 <sup>6</sup>
LT158A	2,78 x 10 <sup>7</sup>	2,02 x 10 <sup>7</sup>	3,07 x 10 <sup>7</sup>	4,74 x 10 <sup>7</sup>	9,90 x 10 <sup>6</sup>
LT350	5,10 x 10 <sup>6</sup>	9,93 x 10 <sup>6</sup>	3,58 x 10 <sup>6</sup>	1,84 x 10 <sup>7</sup>	5,60 x 10 <sup>6</sup>
LT360	2,48 x 10 <sup>6</sup>	2,33 x 10 <sup>6</sup>	4,07 x 10 <sup>6</sup>	2,80 x 10 <sup>6</sup>	2,19 x 10 <sup>6</sup>
LT361	1,16 x 10 <sup>7</sup>	1,21 x 10 <sup>7</sup>	2,13 x 10 <sup>7</sup>	3,59 x 10 <sup>6</sup>	5,54 x 10 <sup>6</sup>
LT482	2,07 x 10 <sup>6</sup>	3,88 x 10 <sup>6</sup>	5,19 x 10 <sup>6</sup>	4,92 x 10 <sup>6</sup>	1,84 x 10 <sup>6</sup>
LT484	1,86 x 10 <sup>7</sup>	1,94 x 10 <sup>7</sup>	2,74 x 10 <sup>7</sup>	1,71 x 10 <sup>7</sup>	5,57 x 10 <sup>6</sup>
LT510	9,80 x 10 <sup>6</sup>	5,21 x 10 <sup>6</sup>	9,60 x 10 <sup>6</sup>	1,60 x 10 <sup>7</sup>	8,43 x 10 <sup>6</sup>
LT516	2,99 x 10 <sup>6</sup>	4,23 x 10 <sup>6</sup>	6,22 x 10 <sup>6</sup>	2,40 x 10 <sup>6</sup>	2,15 x 10 <sup>6</sup>
LT518	8,60 x 10 <sup>6</sup>	6,98 x 10 <sup>6</sup>	3,08 x 10 <sup>6</sup>	1,11 x 10 <sup>7</sup>	2,85 x 10 <sup>6</sup>
LT520	2,52 x 10 <sup>6</sup>	4,70 x 10 <sup>6</sup>	8,32 x 10 <sup>6</sup>	7,92 x 10 <sup>6</sup>	5,66 x 10 <sup>6</sup>
Média	8,40 x 10 <sup>6</sup>	8,34 x 10 <sup>6</sup>	1,33 x 10 <sup>7</sup>	1,54 x 10 <sup>7</sup>	4,77 x 10 <sup>6</sup>
<i>Mean</i>					
Percentual	100	99,29	158,33	183,33	56,79
<i>Percentage</i>					

Tabela 11 - Sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos

Table 11 - Sensibility of isolates to different antibiotics

Antibiótico <i>Antibiotic</i>	Isolado <i>Isolate</i>											
	154A	156B	158A	350	360	361	482	484	510	516	518	520
Sulfazotrim	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina <i>Gentamicin</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina <i>Cefalotine</i>	R	R	R	I	S	I	R	S	R	S	I	S
Kanamicina <i>Kanamycin</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amicacina <i>Amicacin</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol <i>Chloranfenicol</i>	I	I	R	I	I	I	I	R	I	I	S	S
Carbencilina <i>Carbenicilin</i>	I	R	R	I	S	S	I	R	R	I	I	S
Ampicilina <i>Ampicilin</i>	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S
Cefoxitina <i>Cefoxitine</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina <i>Tetracycline</i>	R	R	R	I	S	I	R	R	R	S	S	S
Cefazolina <i>Cefazoline</i>	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	R
Cefotaxima <i>Cefotaxime</i>	R	R	R	I	I	I	I	R	I	I	S	I

R → Resistente.

R → *Resistent*.

I → Intermediário.

I → *Intermediary*.

S → Sensível.

S → *Sensible*.



Tabela 12 - Atividade antagonista dos isolados frente a uma estirpe de *Escherichia coli* enteropatogênicaTable 12 - Antagonistic activity of isolates to an enteropathogenic *E. coli* strain

Isolado Isolate	Diâmetro (mm) dos halos de inibição Inhibition halo diameter (mm)	Inibição Inhibition
LT154A	13	Moderada
LT156B	16	Forte
LT158A	18	Forte
LT350	12	Moderada
LT360	12	Moderada
LT361	12	Moderada
LT482	11	Moderada
LT484	11	Moderada
LT510	13	Moderada
LT516	18	Forte
LT518	14	Moderada
LT520	16	Forte

Moderada (Moderate)

Forte (Strong).

### Conclusões

Os isolados LT 158A e LT 516 apresentaram melhores desempenhos para serem usados como probiótico. No teste de antagonismo à estirpe de *Escherichia coli*, os isolados LT 158A e LT 516 foram muito eficientes, apresentando 18 mm no diâmetro do halo. Qualquer um dos dois isolados, ou ambos simultaneamente, podem ser usados como probiótico em bezerros.

### Referências Bibliográficas

- AGOSTINHO, S.M.M. *Comportamento do Lactobacillus acidophilus H2B20 sob condições do trato digestivo "in vitro" e efeito de métodos de preservação em sua atividade*. Viçosa: UFV, 1988. 70p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- CHASSY, B.M., GIUFFRIDA, A. 1980. Method for the lysis of gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 39:153-158.
- 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.A. 1960. medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23:130-135.
- FLOCH, M.H., GERSHENGOREN, W., DIAMOND, S. et al. 1970. Cholic acid inhibition of intestinal bacteria. *The Amer. J. Clin. Nut.*, 23:8-10.
- GILLILAND, S.E., NELSON, C.R., MAXWELL, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Envir. Microb.*, 49:377-381.

- GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. NAUYOK JR., G.F. et al. 1978. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. *J. Dairy Sci.*, 61:1-10.
- HAMDAN, I.Y., MIKOLAJCIK, E.M. 1974. Growth, viability and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *The J. Antib.*, 27:631-636.
- KANDLER, O., WEISS, N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. (Ed.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. p.1208-1234.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), "Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests". M2 T3, 3:14, 1983.
- NOH, D.O., GILLILAND, S.E. 1993. Influence of bile on celular integrity and b-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 76:1253-1259.
- PAULO, E.M. *Isolamento e caracterização de Lactobacillus acidophilus de fezes de suínos para uso como probiótico*. Viçosa: UFV, 1991. 73p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- 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) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- SHAHANI, K.M., CHANDAN, R.C. 1979. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 62:1685-1694.
- SPECK, M.L. 1962. Startes culture growth and action in milk. In: SYMPOSIUM ON LACTIC STARTERS CULTURES. *J. Dairy Sci.*, 45:1281-1286.
- STAMER, J.R. 1979. The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food Technology*, 33:60-65.
- VAKIL, J.R., CHANDAN, R.C., PARRY, R.M. et al. 1969. Susceptibility of several microorganisms to milk lysozymes. *J. Dairy Sci.*, 52:1192-1197.
- WISTREICH, G.A., LECHTMAN, M.D. 1976. *Microbiology and human disease*. 2.ed. California: Collier Macnillan Canada Ltda. 905p.

Recebido em: 04/12/97

Aceito em: 08/02/99