

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**SELEÇÃO E TRIAGEM *IN VITRO* DO
POTENCIAL PROBIÓTICO DE LINHAGENS
DE *Lactobacillus fermentum***

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por André Luiz Bispo Oliveira aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de outubro de 1998.

Campinas, 05 de outubro de 1998


Prof. Dr. VANDERLEI P. CANHOS
Presidente da Banca

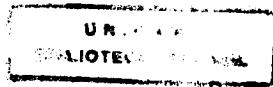
**André Luiz Bispo Oliveira
Engenheiro Agrônomo**

**Vanderlei Perez Canhos
Orientador**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestre em Ciência de
Alimentos.**

Campinas – SP
1998

1102382

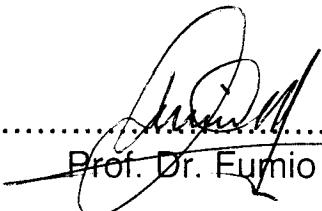


BANCA EXAMINADORA



.....
Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos

Orientador



.....
Prof. Dr. Fumio Yokoya

Membro



.....
Dr. Gilson P. Manfio

Membro

.....
Prof. Dr. Hélia H. Sato

Suplente

Aos meus pais...

Agradecimentos

Ao professor Dr. Vanderlei P. Canhos, pela confiança e apoio depositados em todos os momentos.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo curso de Mestrado.

Ao CNPq pelo aporte financeiro.

À Fundação Tropical André Tosello pelas portas sempre abertas. Aos seus funcionários, bolsistas e estagiários e, em especial, ao Dr. Gilson Manfio, Inácia, Márcia e Edna pelo suporte material e técnico oferecidos.

A todos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana presentes durante todo o período de meu trabalho. À Daniela e Prof. Dr. Lúcia Durrant, em especial, pela solicitude e conhecimentos transmitidos.

Àos incansáveis amigos Amaury, Cathia, Manuela e Fernanda pelos empurrões nos momentos certos.

À Rose pelo resgate e apoio nos momentos mais difíceis.

A todos os demais amigos e colegas que contribuiram para a concretização deste trabalho.

Conteúdo

Conteúdo:.....	i
Conteúdo das tabelas:.....	ii
Conteúdo das figuras:.....	iii
Lista de abreviações:.....	iv
Resumo:.....	v
Abstract:.....	vi
Objetivo:.....	vii
 1. INTRODUÇÃO	1
 2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Probióticos	2
2.1.1. Definição	2
2.1.2. Histórico do emprego	3
2.1.3. Tendências e perspectivas	4
2.1.4. Patentes	6
2.2. Uso de <i>Lactobacillus fermentum</i> como probiótico.....	7
2.3. Métodos rápidos para seleção e triagem de microrganismos probióticos.....	10
2.4. Utilização de métodos rápidos para o “screening” de bactérias	12
2.4.1. Microplacas em testes de inibição	14
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Linhagens utilizadas.....	15
3.1.1. Reativação das linhagens para os ensaios.....	18
3.2. Seleção para resistência	18
3.2.1. Definição da concentração do inibidor	18
3.3. Seleção em microplacas	19
3.3.1. Preparo das microplacas	19
3.3.2. Ensaio de resistência a sais de bile	20
3.3.3. Ensaio de resistência a antibióticos	20
3.3.4. Ensaio de resistência a pH ácido	21
3.3.5. Ensaio de resistência à presença de oxigênio	21
3.4. Análise dos resultados	21
3.4.1. Análise com base no tempo de indução ($1-\Delta t$)	21
3.4.2. Análise com base na velocidade específica de crescimento ($1-\mu\%$)	22
3.5. Ensaios em placas de Petri.....	23
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24

4.1. Determinação da resistência a sais de bile em microplacas	24
4.1.1. Definição da concentração inibitória de sais de bile.....	24
4.1.2. Ensaio cinético de resistência a sais de bile em microplacas	28
4.1.2.1. Determinação de 1-Δt	28
4.1.2.2. Determinação de 1-μ%	31
4.1.3. Ensaios em placas de Petri.....	33
4.2. Determinação da resistência a antibióticos em microplacas	35
4.2.1. Definição das concentrações inibitórias de antibióticos	35
4.2.2. Ensaios cinéticos de resistência à colistina, virginiamicina e bacitracina de Zn .	40
4.2.2.1.Determinação de 1-Δt	40
4.2.2.2. Determinação de 1-μ%	43
4.3. Determinação da resistência a pH ácidos em microplacas.....	47
4.3.1. Definição da Concentração de pH inibitória	47
4.3.2. Ensaio cinético de resistência a pH ácido	49
4.3.2.1.Determinação de 1-Δt	49
4.3.2.2. Determinação de 1-μ%	52
4.3.3. Ensaios em placas de Petri.....	54
4.4. Determinação da resistencia ao O ₂ em microplacas.....	56
4.4.1. Determinação de 1-Δt	56
4.4.2. Determinação de 1-μ%	58
4.4.3. Ensaios em placas de Petri.....	60
4.5. Análise final dos testes de resistência.....	62
5. CONCLUSÕES	64
6. BIBLIOGRAFIA	66

Conteúdo das tabelas

Tabela 1: Relação das linhagens de <i>Lactobacillus</i> utilizadas nos experimentos.....	16
Tabela 2: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a sais de bile, valores 1-Δt.....	27
Tabela 3: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a sais de bile, valores de 1-Δt e comparação estatística pelo teste de Duncan (P<0.05).	30
Tabela 4: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a sais de bile, valores de 1-μ% e comparação estatística pelo teste de Duncan (P<0.05).	32
Tabela 5: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a sais de bile, valores de 1-μ%, 1-Δt e do teste de resistência a três concentrações de bile em placas de Petri.....	34
Tabela 6: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a bacitracina de Zn, virginiamicina e colistina, valores de 1-Δt.	40
Tabela 7: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn, valores de 1-Δt.	42
Tabela 8: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn, valores de 1-μ%.	44
Tabela 9: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> à virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn resultados dos testes em placas de Petri. 46	
Tabela 10: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a baixos valores de pH, valores de 1-Δt.	49
Tabela 11: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a pH 3.0, valores de 1-Δt.	51
Tabela 12: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a pH 3.0, valores de 1-μ%.	53
Tabela 13: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> a pH 3.0, resultados dos testes em placas de Petri.	55
Tabela 14: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> à presença de O ₂ no meio, valores de 1-Δt.	57
Tabela 15: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> à presença de O ₂ no meio, valores de 1-μ%.	59

Tabela 16: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* ao O₂, resultados dos testes em placas de Petri 61

Tabela 17: Linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* resistentes a sais de bile, virginiamicina, colistina, pH ácido e presença de oxigênio, resultado final dos testes em microplacas (1-Δt)..... 63

Conteúdo das figuras

Figura 1: Configuração de uma microplaca utilizada nos ensaios de resistência.....	20
Figura 2: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053 a sais de bile.....	25
Figura 3: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT1400 a sais de bile.....	25
Figura 4: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 2571 ^T a sais de bile.....	26
Figura 5: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a 0.31% de sais de bile.....	26
Figura 6.: Seleção para resistência a sais de bile das 42 linhagens de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , correlação entre os resultados de 1-Δt e 1-μ%. .	33
Figura 7: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 2571 ^T à virginiamicina.....	35
Figura 8: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 2571 ^T à colistina.....	36
Figura 9: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 2571 ^T à bacitracina de Zn.....	36
Figura 10: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a 30ppm de colistina.....	38
Figura 11: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a 30ppm de bacitracina de Zn.....	38
Figura 12: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1053, 1400 e 2571 ^T a 0.7ppm de virginiamicina.....	39
Figura 13: Seleção para resistência à virginiamicina das 42 linhagens de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , correlação entre os resultados de 1-Δt e 1-μ%. .	45
Figura 14: Seleção para resistência à colistina das 42 linhagens de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , correlação entre os resultados de 1-Δt e 1-μ%... .	45
Figura 15: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> linhagem CCT 1053 a pH baixos... .	47
Figura 16: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> linhagem CCT 1400 a pH baixos....	48
Figura 17: Resistência de <i>Lactobacillus fermentum</i> linhagem CCT 2571 ^T a pH baixos.	48
Figura 18.: Seleção para resistência à presença de O ₂ das 41 linhagens de <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , correlação entre os resultados de 1-Δt e 1-μ%.	60

Lista de abreviações

μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
Δ	Delta
ATCC	American Type Culture Collection
BUSCSAV	Biologicky Ustav Ceskolovenska Akademie Ved
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CIP	Collection of the Institute Pasteur
DSM	Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
IAM	Institute of Applied Microbiology
IFO	Institute for Fermentation
JCM	Japan Collection of Microorganisms
NCDO	National Collection of Dairy Organisms
NCFM	North Carolina Food Microbiology
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria
NCTC	National Collection of Type Cultures
NRIC	NODAI Research Institute Culture Collection
OUT	Department of Fermentation Technology, Osaka University
UFVCC	Coleção de Culturas Universidade Federal de Viçosa

Resumo

Neste estudo foram testadas 38 linhagens de *Lactobacillus fermentum* através de metodologia de triagem orientada para probióticos, com ensaios de resistência a sais de bile, a antibióticos comumente utilizados em rações para suínos, a pH ácido e a presença de oxigênio. Para a seleção dos probióticos, foram utilizadas dosagens de inibidores menores do que aquelas definidas em literatura para ensaios de resistência não cinéticos. As dosagens foram padronizadas utilizando-se três linhagens de *Lactobacillus fermentum*, aleatoriamente escolhidas dentre as 38 testadas, através do método da dose mínima inibitória adaptada a microplacas. A análise das curvas de crescimento das 38 linhagens de *Lactobacillus fermentum* foi realizada por comparação do crescimento simultâneo das linhagens em meios com e sem o inibidor. Três linhagens de *Lactobacillus acidophilus*, utilizadas em probióticos disponíveis no mercado, foram empregadas como controle positivo. Para cada inibidor, foram realizados 82 ensaios cinéticos simultâneos em microplacas, perfazendo um total de 492 curvas de crescimento, analisadas com metodologia baseada no tempo de indução ($1-\Delta t$) em comparação à variação da velocidade específica de crescimento ($1-\mu\%$) das linhagens. Os resultados levaram à seleção de quatro linhagens para estudos posteriores por apresentarem resistência simultânea a pelo menos 4 dos 6 inibidores testados (saís de bile, virginiamicina, colistina, bacitracina de Zn, pH 3.0 e presença de oxigênio).

Abstract

In the present study, 38 *Lactobacillus fermentum* strains were screened applying a methodology designed to identify potential probiotics using trials based on their resistance to bile salts, antibiotics commonly used in porcine feed, low pH and oxygen. Probiotics, were screened at a defined concentration of inhibitor, below the value stated by the literature for non kinetical assays, determined by growing three randomly selected *Lactobacillus fermentum* strains with a Minimum Inhibitory Dose Method adapted to microplate. The analysis of the 38 *Lactobacillus fermentum* strains was performed by comparison of their simultaneous growth in a medium with and without the inhibitor. Three commercially available probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, were used as positive controls. For each inhibitor, 82 kinetic results were simultaneously obtained from microplates. The four inhibitors tested generated a total of 492 growth curves analysed by two methods, based on the induction time ($1-\Delta t$) and growth rate ($1-\mu\%$). The methodology developed allowed the selection of four *Lactobacillus fermentum* strains with high probiotic potential for future studies, which presented simultaneous resistance to four of the 6 tested inhibitors (bile salts, virginiamycin, colistin, zinc bacitracin, pH 3.0 and oxygen).

Objetivo

Estabelecimento de um método *in vitro* para a avaliação simultânea da resistência de um grande número de bactérias lácticas quanto a sais de bile, antibióticos, acidez e tensão de oxigênio, visando comparar linhagens de *Lactobacillus fermentum* com linhagens utilizadas em probióticos disponíveis no mercado.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas são comumente citadas como as reguladoras do trato gastrointestinal do homem e de outros animais. Uma série de ações benéficas lhes são atribuídas, como antagonismo a microrganismos patogênicos, aumento da resposta imunológica do hospedeiro, redução dos níveis do colesterol sérico, degradação de nitrosaminas e produção e liberação de β -galactosidase no lúmen intestinal (GILLILAND,1979; TANNOCK,1990; NAITO,1995).

Entretanto a aplicação desses microrganismos como probióticos é ainda controversa em termos de resultados concretos, necessitando-se dados científicos mais consistentes (AXELLSSON,1993).

Várias citações relacionam a ineficiência de alguns probióticos comerciais a orientações equivocadas de seleção e triagem com enfoques voltados para a determinação de características tecnológicas em detrimento de características ecológicas, como a habilidade de sobreviver e colonizar o trato digestivo (O'SULLIVAN *et al.*, 1992).

O presente trabalho visa a avaliação de metodologia para a seleção e triagem de linhagens bacterianas com potencial probiótico, estabelecendo uma rotina simplificada de teste da resistência de linhagens de *Lactobacillus fermentum* a sais de bile, pH baixos, antibióticos e ao crescimento na presença de oxigênio em microplacas, valendo-se de um método rápido e de fácil análise para os resultados de até 96 ensaios simultâneos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Probióticos

2.1.1. Definição

O termo probiótico, utilizado em várias áreas da biologia (protozoologia, imunologia e outros), deriva do grego *pro biosis*, ou seja, em favor da vida (O'SULLIVAN *et ali*, 1992).

A adoção deste termo em estudos de microecologia/microbiologia gastrointestinal foi proposta primeiramente em 1974, por Parker, para designar todo suplemento nutricional - organismos ou substâncias - com a capacidade de afetar benicamente o animal hospedeiro através do balanceamento de sua microbiota intestinal, como sendo probiótico (FULLER, 1989).

Até então a literatura referente ao controle da microbiota intestinal do homem e dos animais domésticos com microrganismos vinha sendo estudada sob a ótica de vários autores, que utilizavam termos como antagonismo bacteriano (Freter, 1956), interferência bacteriana (Dubos, 1963), efeito barreira (Ducluzeau *et ali*, 1970), resistência à colonização (Van der Waaij *et ali*, 1971) e competição exclusiva (Lloyd *et ali*, 1977), os quais, em essência, diferem do termo probiótico por não se importarem tanto com a identificação das linhagens, dando maior relevância aos efeitos benéficos gerados pelas mesmas (*apud* DAY, s.d.; FULLER, 1989).

A definição adotada neste trabalho é a que descreve os probióticos como sendo um monocultivo ou uma mistura de microrganismos definidos e vivos que, aplicados tanto no homem como em animais, afetam o hospedeiro benicamente pelo estímulo à microbiota endógena (HUIS IN'T VELD e HAVENAAR, 1991).

Esta definição pressupõe o conhecimento do caráter biológico das espécies de microrganismos utilizadas e o largo espectro de uso do produto, prevendo-se a sua aplicação tanto nas áreas da saúde humana como animal.

2.1.2. Histórico do emprego

As primeiras citações sobre os efeitos benéficos de microrganismos vivos no trato intestinal remontam à antiguidade. Existe ainda hoje referências às longínquas recomendações do historiador romano Plínio em 76 a.C. para o uso de leites fermentados no tratamento de várias formas de infecções intestinais (O'SULLIVAN *et al.*, 1992).

No período transcorrido do final do século XIX aos anos 40, com o surgimento dos primeiros resultados positivos de crescimento de um animal gnotobiótico (isento de microrganismos na superfície e nos órgãos internos), vários dos microrganismos do sistema digestivo foram isolados e classificados, enriquecendo o debate sobre a função desses microrganismos no sistema digestivo (MITSUOKA, 1978, 1989).

O estudo sistemático dos microrganismos normalmente presentes no intestino originou-se das pesquisas de Escherich, em 1885. Seus estudos sobre gastroenterite e desnutrição infantil, realizadas na Universidade de Viena, o levaram à descoberta dos colibacilos, inicialmente classificados como *Bacterium coli communior* e, posteriormente, reclassificados como *Escherichia coli* (MITSUOKA, 1978, 1989).

Em 1899, Tissier, então pesquisador do Instituto Pasteur, realizou estudos sobre a microbiota do sistema digestivo de recém-nascidos e descobriu as bifidobactérias, classificadas inicialmente como *Bacillus bifidus* e posteriormente *Bifidobacterium* sp. (MITSUOKA, 1978, 1989).

Em 1900, Moro, descobriu uma nova espécie de microrganismo isolada das fezes de recém-nascidos alimentados com leite materno, classificando-a como *Bacillus acidophilus*, posteriormente reclassificada como *Lactobacillus acidophilus* (MITSUOKA, 1978, 1989).

Moro foi o primeiro pesquisador a propor a existência de um grupo de bactérias residentes no intestino, exercendo uma ação preventiva contra a invasão de microrganismos patogênicos (MITSUOKA, 1978, 1989).

Em 1906, Tissier propôs o uso de espécies de *Bifidobacterium* sp. no tratamento de casos de diarréia infantil (O'SULLIVAN et al., 1992).

Em 1907, Metchnicoff apresentou a primeira hipótese sobre a regulação da microbiota e fisiologia intestinal por lactobacilos, após a constatação da correlação da longevidade dos povos dos Balcãs com o elevado consumo de iogurtes (O'SULLIVAN et al., 1992).

2.1.3. Tendências e perspectivas

Nos últimos noventa anos, vários pontos foram esclarecidos contudo, dada a elevada complexidade do trato gastrointestinal, ainda persistem dúvidas quanto a totalidade de microrganismos e a natureza das interações existentes nesse ambiente (DRASAR et al., 1969; TANNOCK, 1990; BIOGAIA BIOLOGICS AB, 1995).

Em recente revisão sobre o assunto SCHUT, 1996, levanta uma série de questões ainda não esclarecidas do ponto de vista científico e que devem ser investigadas para uma melhor compreensão dos probióticos:

1. ainda não se sabe qual o efeito do sistema imunológico na microbiota do trato gastrointestinal e o local em que se dá o contato do microrganismo com o seu hospedeiro;
2. fisiologicamente existem dúvidas quanto aos componentes envolvidos nas relações entre os probióticos e seus hospedeiros;
3. não se têm muitas informações sobre a atividade dos microrganismos probióticos e a sua localização no hospedeiro;

C - Testes *in vitro*.

Aderência a células cultivadas do intestino (teste *in vitro*).

Produção elevada de ácidos orgânicos (relacionado com a inibição de bactérias indesejáveis).

Habilidade de crescer bem a 37°C.

Resistência a sais de bile.

Resistência a condições de acidez.

Facilidade de cultivo e alta viabilidade.

Os microrganismos devem fazer parte da microbiota autóctone do intestino do hospedeiro.

D – Testes *in vivo*.

Estudo da sobrevivência e colonização do intestino do hospedeiro pelo probiótico.

Testes de campo demonstrativos da eficácia do probiótico.

Sistemas de monitoramento das linhagens utilizadas visando a fácil diferenciação das linhagens autóctones.

2.1.4. Patentes

A existência de um razoável número de solicitações de patentes nos últimos 3 anos ilustram a importância tecnológica e econômica do tema.

Pesquisando-se as bases de dados sobre patentes do INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. <http://www.inpi.gov.br/>) e da IBM (International Business Machines, EUA. <http://www.patents.ibm.com/ibm.html>), descobriu-se trinta patentes relacionadas ao tema probióticos:

As patentes US4910024, da Micro Chemical Inc, US5292657, da Pioneer Hi-Bred International Inc., US5614209 e US5633012, da Lafor Laboratories Ltd., ilustram a face mais próxima ao mercado. As três empresas propõem tecnologias para se administrar doses dos microrganismos probióticos em sua forma viável nas aplicações tanto humana como animal por meio de pequenos aparelhos (US4910024), encapsulamento

em matriz composta de gorduras com alto ponto de fusão (US5292657) e em matriz hidrossolúvel (US5614209 e US5633012).

Outras patentes, originárias tanto de empresas (US5439678 e US5531988), quanto de Centros de Pesquisa e Universidades (US5308615, US5468479 e US5478557), abordam a composição de microrganismos *per se*, que em razão da dificuldade de identificação também são objetos de patenteamento.

A patente US5439678 relaciona linhagens de *Lactobacillus reuteri* produtores de β-hidroxipropionaldeído eficazes no controle de bactérias, leveduras e protozoários.

A patente US5531988 relaciona um preparado composto de bactérias lácticas, *Bifidobacterium* e imunoglobulinas isoladas de leite e soro de leite bovinos.

As patentes US5308615 e US5478557, do mesmo grupo, versam sobre um grupo de bactérias anaeróbias para o controle de *Salmonella* spp.

A patente US5468479 relaciona uma linhagem de *Streptococcus salivarius* depositada como FERM BP-3885 capaz de produzir dextranase, equilibrar a microbiota intestinal e prevenir cárries.

2.2. Uso de *Lactobacillus fermentum* como probiótico

De acordo com TANNOCK (1990), os lactobacilos podem ser encontrados no trato gastrointestinal, em áreas que vão do esôfago ao cólon. Se comparados às espécies estritamente anaeróbias desse ambiente, os lactobacilos são de cultivo relativamente fácil em laboratório e com maior potencial para a manipulação genética, sendo excelentes ferramentas para o estudo dos mecanismos moleculares e fenômenos microecológicos envolvidos na colonização do intestino (TANNOCK, 1990).

Lactobacillus fermentum é citado por GILLILAND (1979) e MARSHALL (1991) como sendo uma das espécies do gênero *Lactobacillus* usualmente encontradas no trato gastrointestinal do homem. FULLER (1978), em um dos primeiros estudos sobre adesão de microrganismos ao epitélio gástrico de suínos, destaca a predominância de *Lactobacillus fermentum* neste ambiente com incidências de 92% nos leitões sob amamentação e 38% em leitões recém desmamados.

FREDERICK (1994) e SANTOS (1991) citam uma série de artigos que vislumbram a propriedade de adesão de *Lactobacillus fermentum* ao epitélio gástrico e a possível relação com a sua característica de flocação de leveduras em dornas de fermentação alcoólica.

NAITO (1995) identificou *Lactobacillus fermentum* como a espécie predominante de *Lactobacillus* na região intestinal de suínos, nos primeiros 40 dias de vida e sob condições de desmame aos 7 e 35 dias de vida.

Logo após o nascimento, o trato gastrointestinal dos leitões é estéril, existindo ótimas condições para o desenvolvimento de uma microbiota benéfica ou patogênica, dependendo do manejo empregado. As práticas correntes de manejo em granjas de criação intensiva (elevada assepsia, desmame precoce e confinamento), geram condições de estresse variadas e acabam por deixar os leitões mais suscetíveis às infecções .

Observações de FULLER *et ali* (1978) demonstram que populações de *Escherichia coli* isoladas do trato gastrointestinal têm um incremento considerável após o desmame dos leitões, indicando o rompimento de algum mecanismo de controle da microbiota benéfica. Segundo o próprio autor, em 1989, geralmente os leitões obtém uma

microbiota estável oriunda da mãe durante o aleitamento, auxiliando-os a resistirem às infecções .

METCALFE *et ali* (1991) e BLOMBERG (1993), tecem ótimos comentários sobre a capacidade de *Escherichia coli* enterotoxigênicas contendo fímbrias K88 em suas superfícies, ligarem-se a receptores específicos e causarem intoxicações em leitões recém desmamados.

Ao avaliar a inibição desta adesão por linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus crispatus*, isoladas de suínos adultos, BLOMBERG *et ali* (1993) evidenciam a eficiência dos lactobacilos e sugerem um mecanismo de inibição relacionado à liberação de um composto protéico com a capacidade de alterar o muco intestinal, dificultando a adesão da *Escherichia coli*.

Mais recentemente, OUWEHAND e CONWAY (1996) sugeriram que o mecanismo de inibição da adesão de *Escherichia coli* ao muco intestinal pode estar relacionado à morte das células de *Lactobacillus* presentes na região, face à observação de que não havia inibição quando as células permaneciam viáveis.

Ao contrário do anteriormente proposto por BLOMBERG (1993), OUWEHAND e CONWAY(1996) constataram que a capacidade de *Lactobacillus fermentum* inibir a adesão de *Escherichia coli* é melhor representada por um modelo que sugere a presença de um carboidrato originário da lise da parede celular de *Lactobacillus fermentum* inibindo a adesão de *Escherichia coli* ao muco intestinal.

2.3. Métodos rápidos para seleção e triagem de microrganismos probióticos

Definindo "screening" como sendo a seleção e triagem de organismos direcionada para características desejadas, o "screening" de microrganismos probióticos para suínos visa identificar as linhagens com maior potencial de sobrevivência e colonização no trato gastrointestinal desses animais.

Segundo DUNCAN (1995), o trato gastrointestinal é um ambiente extremamente resistente à presença de microrganismos exógenos. No interior do mesmo, antígenos externos, microrganismos benéficos ou patogênicos, vírus, protozoários, toxinas e outros, são sistematicamente excluídos por uma série de mecanismos específicos e não específicos de seu complexo sistema imunológico, garantindo a saúde do animal.

Os mecanismos não específicos em ambiente gástrico, como acidez e liberação de pepsinas, e no intestino, como as secreções de bile e suco pancreático, e a produção de lisozima, muco, movimentos peristálticos e microbiota endógena benéfica atuam como barreiras a eventuais infecções por organismos exógenos (DUNCAN, 1995; WALTER e BLOCH, 1983).

Qualquer ser vivo, para se estabelecer nesse ambiente, terá que ser suficientemente virulento, no caso dos microrganismos patogênicos (DUNCAN 1995), ou resistente, no caso dos probióticos (MARSHALL, 1985).

De acordo com HOSE e SOZZI (1991), o estabelecimento de testes básicos para a seleção e triagem de culturas probióticas é fator de extrema importância para a avaliação das linhagens e elucidação do impacto dos probióticos no trato gastrointestinal.

Na seleção e triagem de quatro espécies utilizadas em um probiótico para suínos, Toptic P®, comercializado na Grã Bretanha, foram adotados procedimentos simplificados *in vitro*

para avaliar as linhagens em termos de velocidades de crescimento, quantidade de ácido láctico produzida, resistência a baixos valores de pH, a sais de bile, aos promotores de crescimento e aos antimicrobianos normalmente contidos nas rações para suínos. Após os testes *in vitro*, os microrganismos foram testados em organismos vivos para se comprovar o efeito probiótico do produto (MINNEY, 1991).

SANDERS (1993) comenta uma série de características desejáveis nas linhagens usadas em preparados probióticos, tais como aderência a células cultivadas do intestino (teste *in vitro*); produção elevada de ácidos orgânicos (relacionado com a inibição de bactérias indesejáveis); habilidade de crescer bem a 37°C; resistência a sais de bile; características fermentativas interessantes (se a forma de apresentação for como alimento); capacidade de sobreviver à passagem pelo estômago; eficácia clínica comprovada; elevada produção de lactase; e conservação de todas as características desejadas durante o processo, o armazenamento e a comercialização do produto.

Por estar relacionada à posterior sobrevivência do microrganismo no intestino, a resistência a sais de bile é um teste importante na seleção e triagem de probióticos. De acordo com OVERDAHL e ZOTTOLA (1991), a bile é liberada no jejuno, durante a digestão, chegando ao íleo. Os microrganismos devem ser bile-tolerantes para sobreviver nessas duas regiões do trato digestivo. Em estudos com bezerros, GILLILAND *et alii* (1984) identificaram uma maior presença de lactobacilos bile-resistentes no jejuno, região esta em que TANNOCK *et alii* (1994) consideraram a mais importante para uma eventual inoculação do bolo alimentar e disseminação dos probióticos ao longo de todo o trato digestivo.

Linhagens de *L. fermentum* foram testadas quanto a resistência aos sais de bile por GILLILAND e SPECK (1977), em um estudo em meio sólido, onde pôde-se visualizar um ótimo resultado para as linhagens puras e recém cultivadas e um resultado de bom a razoável para as linhagens comerciais. O menor desempenho das linhagens comerciais pode estar relacionado à perda de viabilidade devido ao processo de armazenamento.

CHATEAU *et ali* (1994), em estudo cinético em meio de cultura MRS líquido contendo sais de bile (oxgall) a 0,3% confirmaram a resistência de linhagens de *L. fermentum* à bile, mas na conclusão ressaltaram que esta resistência esteve mais relacionada com a linhagem utilizada do que com a espécie.

Reforçando os comentários de OVERDAHL e ZOTTOLA (1991), sobre a importância da existência de microrganismos benéficos na região do íleo, HILLMAN *et ali* (1994) e COSTERTON (1985), consideraram esta região como o principal ponto de infecção de linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas no homem e em outros animais, sendo portanto a região alvo dos probióticos. O íleo é um tubo estreito, com células em constante renovação e relativamente aeróbio, possivelmente devido a alta capilaridade dos vasos sanguíneos no contorno de toda essa região (SAVAGE, 1985; HILLMAN *et ali*, 1993).

De acordo com HILLMAN *et ali* (1994), a escolha dos probióticos tem sido muito direcionada aos lactobacilos anaeróbios, mais adaptados à região do ceco e cólon. Este autor sugeriu que o estudo das populações inerentes ao íleo seja feito sob condições aeróbias.

Devido ao largo emprego de antimicrobianos na criação de animais, DUTTA e DEVRIESE (1981), ressaltaram a importância de se estudar a resistência dos microrganismos probióticos aos antimicrobianos largamente utilizados como promotores de crescimento e na terapia convencional. Em seus estudos, os referidos autores determinaram doses mínimas de vários antimicrobianos sobre lactobacilos.

2.4. Utilização de métodos rápidos para o “screening” de bactérias

A grande demanda de trabalho, tempo e material existente nos procedimentos convencionais para a seleção e triagem de microrganismos, dificulta a manipulação de grandes lotes de isolados. Sob esta ótica, ao longo das últimas décadas, um novo enfoque vem contínua e crescentemente orientando os procedimentos de rotina em laboratórios de

microbiologia no intuito de simplificá-los com técnicas mais rápidas, práticas e automatizadas.

As primeiras tentativas de desenvolvimento de métodos rápidos em microbiologia referem-se à produção de “kits” para a identificação de microrganismos e para a determinação de resistência a antibióticos em laboratórios clínicos durante a década de 1960, havendo um aumento exponencial no número de técnicas e equipamentos para este fim desde as publicações de Hartman (1968) e Skerman (1969), tidas como marco histórico da pesquisa na área, (citados por VASAVADA, 1993).

Dentre os vários equipamentos e procedimentos que podem ser utilizados na caracterização e “screening” de microrganismos, a utilização de leitores automáticos de microplacas (microtiter readers) acoplados ou não a microcomputadores para a coleta e análise dos dados, se destaca pela praticidade e velocidade com que produz um enorme volume de resultados. O equipamento, originalmente definido para testes imunológicos e enzimáticos, faz uso dos conceitos básicos de espectroscopia aliado à capacidade de realizar 96 leituras automaticamente em um tempo médio de 3 minutos por placa.

A aplicabilidade do equipamento e das microplacas para o crescimento microbiano vem sendo estudada há relativamente pouco tempo mas já tem gerado resultados práticos na indústria, com aplicações no “screening” de microrganismos para a produção de enzimas ou compostos de interesse e na identificação semi-automatizada de microrganismos com base em seu metabolismo oxidativo, (CARNAHAN *et al.*, 1989; BOCHNER, 1989; GORDEN *et al.*, 1993; STRONG-GUNDERSON e PALUMBO, 1994).

A grande vantagem do método em microplaca é a possibilidade de se realizar 96 testes ou experimentos simultaneamente em uma mesma placa, sob condições padronizadas e utilizando pequenos volumes de reagentes e meios de cultivo.

2.4.1. Microplacas em testes de inibição

Na atualidade, a classificação de um microrganismo como resistente ou suscetível a fatores externos está largamente fundamentada em decisões empíricas. Alguns testes como a redução do número de células de *Escherichia coli* em plasma de coelho ou a simples diferenciação visual entre as suas curvas de crescimento em meios de cultivo contendo ou não o inibidor exemplificam tal situação e geram estudos pouco reproduzíveis, (LEE *et al.*, 1991).

Ensaios que tentam estabelecer o grau de resistência de um microrganismo face aos inibidores baseiam-se fundamentalmente em determinações da dose mínima inibitória (BRADY e KATZ, 1992), do percentual de inibição após um dado período de tempo, (GRILL *et al.*, 1995), do tempo necessário para o microrganismo atingir uma determinada densidade ótica, (CHATEAU *et al.*, 1994), da redução da velocidade específica de crescimento, (GRILL *et al.*, 1995), e outros, destacados como quantitativos mas fundamentados em alguns dos métodos anteriores, (LEE *et al.*, 1991; KATLA, 1996).

Dentre esses, três são testes de inibição desenvolvidos exclusivamente em microplacas com vantagens marcantes em versatilidade. LEE *et al.* (1991) desenvolveram teste em microplacas para identificar agentes das defesas imunológicas de aves sobre *Escherichia coli*. O método, testado em contraste à seleção em tubos, mostrou-se eficiente e estatisticamente idêntico ao teste em tubos; BRADY e KATZ (1992) elaboraram uma alternativa aos ensaios em placas e tubos de ensaio, até hoje utilizados na determinação da dose mínima inibitória de antimicrobianos. O teste em microplacas foi desenvolvido para se verificar a ação dos antimicrobianos utilizados em granjas de animais, sendo de simples realização, e também uma alternativa prática e ágil aos testes atualmente em uso; KATLA *et al.* (1996) estudaram o potencial inibitório e selecionaram bacteriocinas de *Lactobacillus* sp. crescendo linhagens de *Listeria* sp. na presença dessas proteínas com ação antimicrobiana em microplacas, obtendo resultados discriminatórios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

As 41 linhagens das espécies de *Lactobacillus* utilizadas neste trabalho foram obtidas junto à Coleção de Culturas Tropical (Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", Campinas SP) e estão descritas na Tabela 1. Além das 38 linhagens de *Lactobacillus fermentum*, foram utilizadas para efeito de controle positivo 3 linhagens de *Lactobacillus acidophilus* utilizadas como probióticos. Das linhagens de *Lactobacillus acidophilus*, uma é originária de um produto comercial e as demais da Coleção de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV (Tabela 1).

Todas as linhagens testadas foram cultivadas em caldo MRS (Oxoid) na temperatura de 37°C, por 24-48h, sob aerobiose e ausência de agitação (KANDLER e WEISS, 1986). A pureza das linhagens foi verificada por semeadura em profundidade em placas com os meios em questão acrescidos de 1,2% de ágar, coloração de Gram e teste de catalase. A manutenção das linhagens foi realizada através de congelamento a -80°C em Caldo Nutriente com 10% de Glicerol.

Tabela 1: Relação das linhagens de *Lactobacillus* spp. utilizadas nos experimentos.

***Lactobacillus fermentum* Beijerinck**

0559 ← CIP 53.163 ←. ATCC (1953) . H.P. Sarett: strain 36 ← W. Peterson; =ATCC 9338 =NCTC 6991 =NCIB 8028 =NCDO 215 =IFO 3071 =OUT 8128 =BUSCSAV 233 =CCM 91 =DSM 20391 =CIP 64.53 =JCM 1560.	1055 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower. Flocculent strain.
0845 ← Muro, M.A.. Acid treatment tank of yeast slurry. Usina Rafard, Rafard SP, Brazil. Non-flocculent strain.	1384 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain.
1006 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1385 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).
1016 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1387 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Nisin sensible and flocculent strain.
1017 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower. Flocculent strain.	1397 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).
1019 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1398 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).
1021 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1399 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Nisin sensible and flocculent strain.
1022 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1400 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Nisin sensible and non-flocculent strain.
1024 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1405 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Nisin resistant and flocculent strain.
1025 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1406 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).
1029 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1407 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Non-flocculent strain (flocculent strain depending on cultivation conditions).
1048 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1409 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).
1053 ← Silva, N.. Sugar cane juice cooling tower.	1410 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain.
	1412 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).

1414 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).

1415 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain (moderate).

1417 ← Oliva Neto, P.. Sugar cane juice. Flocculent strain.

2571^T ← JCM 1173 ← ATCC 14931 ← P.A. Hansen BI 28 ← Roy. Techn. Coll., Copenhagen . S. Orla-Jensen 28 (*Betabacterium longum*); =ATCC 14931 =DSM 20052 =NCDO 1750 =NRIC 1752 =CCT 3434. Fermented beets.

3434^T ← JCM 1173 ← ATCC 14931 ← P.A. Hansen BI 28 ← Roy. Tech. Coll, Copenhagen . S.Orla-Jensen 28 (*Betabacterium longum*); =DSM 20052 =NCDO 1750 =NRIC 1752 =CCT 2571. Fermented beets.

4398 ← JCM 1137 ← ATCC 11739 ← Rogosa, M. 19 LC 3; =DSM 20055 =CCRC 12194 =CECT 562 =CIP 102981 =LMG 9846 =NCFB 928. Saliva.

4402 ← JCM 2761 ← Seki, M. M4 ← Tanasupawat,S.. Fermented molasses.

4403 ← JCM 2766 ← Seki, M. M5 ← Tanasupawat, S.. Fermented molasses.

4404 ← JCM 2768 ← Seki, M. M6 ← Tanasupawat, S.. Fermented molasses.

4420 ← JCM 2767 ← Seki, M. M21 ← Tanasupawat, S.. Fermented molasses.

Lactobacillus casei subsp. *casei*

1465^T ← ATCC 393 ← G.J.Hucker 03 ← S.Orla-Jensen 7 (*Streptobacterium casei*); = IAM 12473. Cheese

Lactobacillus acidophilus

4775 ← Variane, Susy ← BIOTECNAL, PROLAC ← Porcine gut

4802 ← UFVCC 1001 ←NCFM ← Gilliland, S.E. ← Rectum of Pig.

4803 ← UFVCC 1002 ←ATCC 43121← NCFM-L ← Gilliland, S.E. ← Rectum of Pig.

3.1.1. Reativação das linhagens para os ensaios

As culturas, estocadas previamente a -80°C, foram descongeladas em banho de gelo e, após três subcultivos em caldo MRS, sob anaerobiose, foram inoculadas nas formulações em estudo. A pureza foi verificada conforme descrito em 3.1.

3.2. Seleção para resistência

A seleção e triagem das 41 linhagens foi testada com base em quatro testes de inibição (sais de bile, pH ácido, antibióticos e presença de oxigênio) descritos em literatura como essenciais sob o aspecto da ecologia de sobrevivência dos microrganismos probióticos no intestino (MINNEY, 1991; SANDERS, 1993).

Para facilitar a seleção estabeleceu-se aqui metodologia para o uso de um equipamento de leitura automática de microplacas (SLT 340ATTC, Áustria), realizando-se testes em placas de Petri para comparação.

3.2.1. Definição da concentração do inibidor

Os inibidores foram testados inoculando-se microplacas conforme a metodologia descrita por BRADY e KATZ (1992), para a obtenção da melhor relação entre o grau de Inibição e a concentração inibitória (dose mínima inibitória).

Com exceção do oxigênio, cuja inibição foi testada somente em termos de presença no meio, doses decrescentes de Sais de Bile, pH e dos antimicrobianos: colistina, virginiamicina e bacitracina de Zn foram testadas em caldo MRS sobre as linhagens de *Lactobacillus fermentum* em microplacas de poliestireno de 96 fossos, realizando-se leituras de $A_{620}\text{nm}$ ao longo do cultivo com o auxílio de um leitor automático de microplacas.

Esta metodologia foi conduzida com três linhagens de coleção, sendo uma linhagem Tipo (CCT 2571^T) e duas escolhidas aleatoriamente (CCT 1053 e CCT 1400). Os resultados foram analisados tendo-se como parâmetros os valores de 1-Δt obtidos com o auxílio do leitor de microplacas para atingir os valores de D.O. 0,3 (tempo de indução), relacionando-se os valores iguais ou maiores que 1 a uma maior resistência e os valores próximos de 0 (zero) a uma maior inibição. A concentração de inibidor escolhida foi aquela em que pelo menos duas das linhagens testadas foram resistentes, para uso futuro como controles.

3.3. Seleção em microplacas

Definidas as dosagens dos inibidores adicionadas ao caldo MRS (item 3.2.1.), realizou-se o teste de resistência das 41 linhagens de *Lactobacillus* em teste, reativadas conforme item 3.1.1.

Com o leitor automático de microplacas, uma série de curvas de crescimento foram obtidas, verificando-se o grau de inibição segundo dois métodos distintos de análise dos resultados.

O crescimento se procedeu com a incubação das linhagens realizada no interior do leitor de microplacas, monitorado-se o crescimento das linhagens turbidimetricamente, pela determinação da absorbância ($A_{620\text{nm}}$) a cada 2h, durante 32h de cultivo.

3.3.1. Preparo das microplacas

A microplaca foi dividida em dois campos, com quatro linhas para o inibidor e quatro linhas para o controle (caldo MRS simples), depositando-se em cada orifício um volume de 200 μL de meio e 5 μL de inóculo (Figura 1).

Após a inoculação, as microplacas foram incubadas com a tampa fechada (para evitar evaporação) sob aerobiose no leitor a 37°C por 32h realizando-se as leituras das microplacas a cada 2h. As leituras foram realizadas por turbidimetria ($A_{620\text{nm}}$) usando-se o

leitor automático de microplacas (SLT 340ATTC, Áustria) acoplado a um microcomputador XT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0559	0845	1006	1016	1019	1021	1022	1024	1025	1029	1048	1053
B	1055	1384	1385	1387	1397	1398	1399	1400	1405	1406	1407	1409
C	1410	1412	1414	1415	1417	1465	1467	2571	3434	4398	4402	4403
D	4404	4420	4775	4802	4803							
E	0559	0845	1006	1016	1019	1021	1022	1024	1025	1029	1048	1053
F	1055	1384	1385	1387	1397	1398	1399	1400	1405	1406	1407	1409
G	1410	1412	1414	1415	1417	1465	1467	2571	3434	4398	4402	4403
H	4404	4420	4775	4802	4803							

Figura 1: Configuração de uma microplaca utilizada nos ensaios de resistência.

3.3.2. Ensaio de resistência a sais de bile

O crescimento das linhagens foi observado no meio MRS líquido (Oxoid) com a adição de 0,3% de sais de bile (Bacto-Oxgall, Difco) conforme o item 3.3.1..

3.3.3. Ensaio de resistência a antibióticos

Os antibióticos promotores de crescimento aqui testados foram Virginiamicina, Colistina e Bacitracina de Zn e representam os mais utilizados pela indústria de rações¹ na formulação de rações pré-iniciais e iniciais de leitões, de acordo com a legislação em vigor no país (BRASIL, 1992):

¹ Sr. MANUEL BECKES (SINDIRAÇÃO, SP), comunicação pessoal.

Para a configuração do ensaio as dosagens de 0,7 ppm para virginiamicina e 50 ppm para bacitracina de Zinco e colistina foram acrescidas ao caldo MRS (Oxoid), distribuindo-se as formulações nas microplacas conforme o item 3.3.1.

3.3.4. Ensaio de resistência a pH ácido

Foi observado o crescimento das linhagens em caldo MRS (Oxoid) a pH 3 conforme o item 3.3.1.

3.3.5. Ensaio de resistência à presença de oxigênio

A inibição do crescimento pela presença de ar atmosférico foi observada em caldo MRS (Oxoid) conforme o item 3.3.1., cultivando-se as linhagens aerobicamente e em jarras de anaerobiose enriquecidas com CO₂ (Anaerocult®, Merck).

3.4. Análise dos resultados

3.4.1. Análise com base no tempo de indução (1-Δt)

O cálculo de 1-Δt fundamenta-se na determinação do tempo decorrido entre a inoculação e o início da fase exponencial de crescimento (Tempo de Indução), definido aqui como o tempo t para que cada uma das linhagens alcance um determinado valor de densidade ótica (D.O.)

No equipamento de leitura de microplacas, selecionou-se o valor de D.O. desejado (0.3nm) e, com o auxílio de um comando simples, determinou-se o tempo decorrido para as linhagens atingirem 0.3nm nos meios simples e com o agente inibidor.

A partir dos parâmetros de absorbância obtidos ao longo do tempo de ensaio, calcula-se o logaritmo do tempo de crescimento de cada uma das linhagens no meio simples ($\log t_s$) e

no meio com inibidor ($\log t_i$), preparando os dados para o cálculo final de $1 - \Delta t$, aritmeticamente, com o auxílio de um programa de planilha eletrônica (Excel, Microsoft).

O cálculo do valor $1 - \Delta t$ foi realizado segundo a seguinte fórmula:

$$1 - \Delta t = 1 - (\log t_{\text{em meio simples}} - \log t_{\text{na presença do inibidor}})$$

Analizando-se o cálculo, observa-se que a subtração de $\log t_s$ por $\log t_i$ é igual à divisão de $\log t_s$ por t_i . Desse modo, o dado Δt nada mais é do que uma medida de proporcionalidade entre os dois tempos de indução.

Os maiores valores de $1 - \Delta t$ relacionam-se a uma maior resistência das linhagens.

3.4.2. Análise com base na velocidade específica de crescimento ($1 - \mu\%$)

Com a geração de resultados cinéticos (estudo de variáveis em função do tempo) pelo uso das microplacas, também selecionou-se as linhagens calculando-se as suas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) nos meios simples e com inibidor.

O cálculo da velocidade específica de crescimento é um procedimento padrão em ensaios cinéticos (BORZANI, 1986) tendo sido empregado neste trabalho para o controle do valor do tempo de indução (item 3.4.1.).

A análise foi realizada ao final de todos os ensaios práticos, com a manipulação dos dados gerados pelo leitor de microplacas sob a forma de arquivos de troca de dados (terminação ASC). Os resultados relativos a crescimentos de todas as linhagens em teste foram repassados a um programa de planilha eletrônica (Excel, Microsoft) a fim de se organizar e separar os crescimentos das linhagens, gerando-se uma curva de crescimento por microrganismo.

Um programa específico para ajuste polinomial de curvas de crescimento pelo método SPLINE (FERRAZ, 1995) e também para o cálculo das velocidades específicas de crescimento $\mu(h^{-1})$ foi utilizado.

O valor de $1-\mu_{\text{máx}} \%$ foi calculado segundo a fórmula:

$$1 - \mu_{\text{máx}} \% = 1 - (\mu_{\text{máx}} \text{ na presença do inibidor} / \mu_{\text{máx}} \text{ em meio simples})$$

relacionando-se a maior ação inibidora aos menores valores de $1-\mu_{\text{máx}}$.

3.5. Ensaios em placas de Petri

Para efeito de comparação, os testes de resistência aos sais de bile, a antibióticos, a pH ácidos e à presença do O₂ descritos em 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4 e 3.3.5 foram realizados também em formulações do meio MRS solidificado utilizando-se para tal, um multinoculador de placas com a capacidade de inocular 25 linhagens por placa.

A reativação das linhagens foi feita da forma explicitada em 3.1.1 e a incubação das placas foi feita sob condições de aerobiose a 37°C e leitura após 24h de cultivo. A leitura dos resultados foi visual, expressando-se os mesmos em termos de presença ou ausência de inibição.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da resistência a sais de bile em microplacas

4.1.1. Definição da concentração inibitória de sais de bile

A capacidade de crescimento em meios contendo sais de bile é uma das características de grande importância, visto que o habitat dos lactobacilos inicia-se no jejuno, onde a concentração de sais de bile é maior.

As figuras 2, 3 e 4 demonstram as características de crescimento das cepas CCT 1053, 1400 e 2571^T (médias de dois ensaios) mantidas a 37°C em caldo MRS sem e com a adição de 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 e 5.0% de sais de bile.

Observa-se visualmente que para as linhagens CCT 1053 e 2571^T, durante a fase estacionária do crescimento, as curvas estão em um patamar superior nas menores dosagens do inibidor (0.04 e 0.08%), sugerindo um maior crescimento decorrente de um possível efeito benéfico de resíduos de sais ou outros compostos originários dos sais de bile Oxgall, um produto derivado da secagem de solução não purificada de bile de origem bovina e suína (DIFCO, 1978).

A linhagem CCT 1400, ao contrário mantém o perfil de inibição esperado neste tipo de teste, com a inibição do crescimento proporcional ao aumento da concentração dos sais de bile.

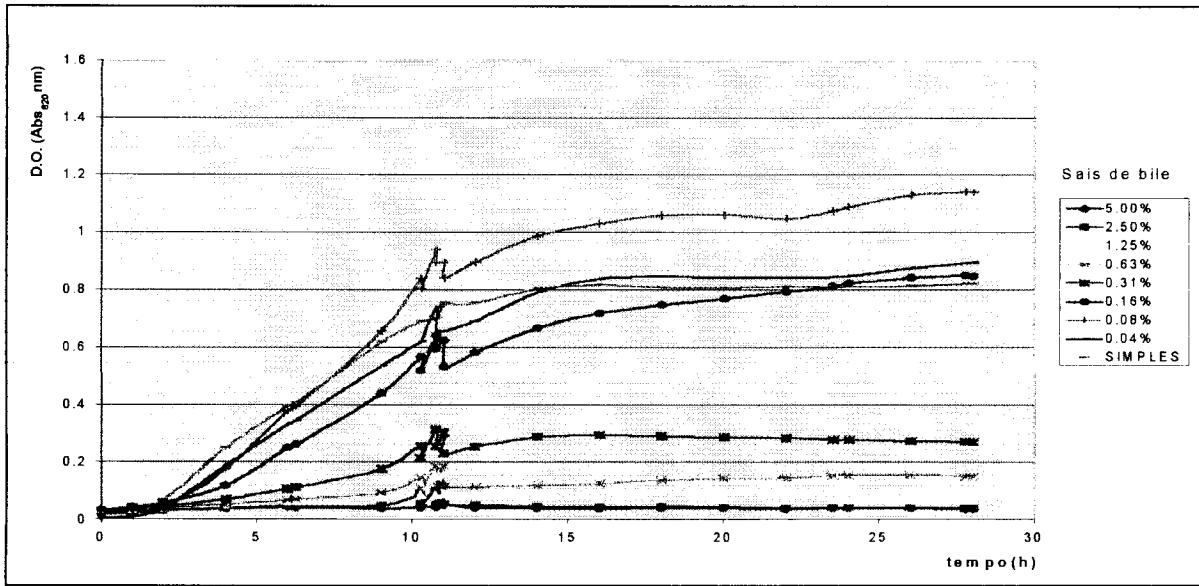


Figura 2: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053 a sais de bile.

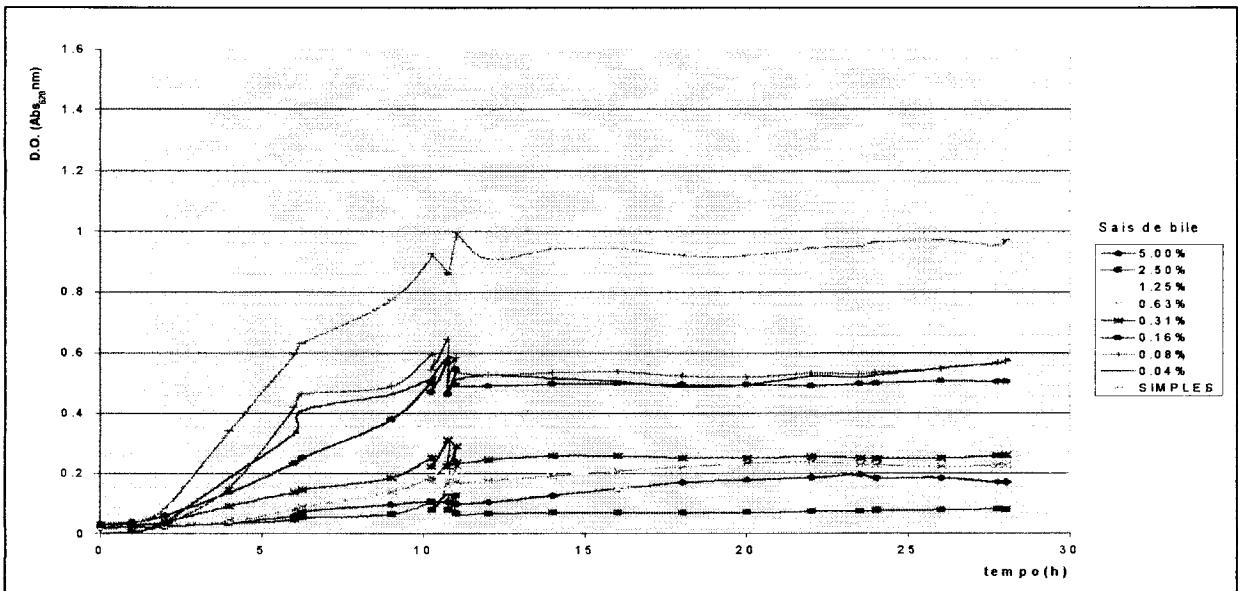


Figura 3: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT1400 a sais de bile.

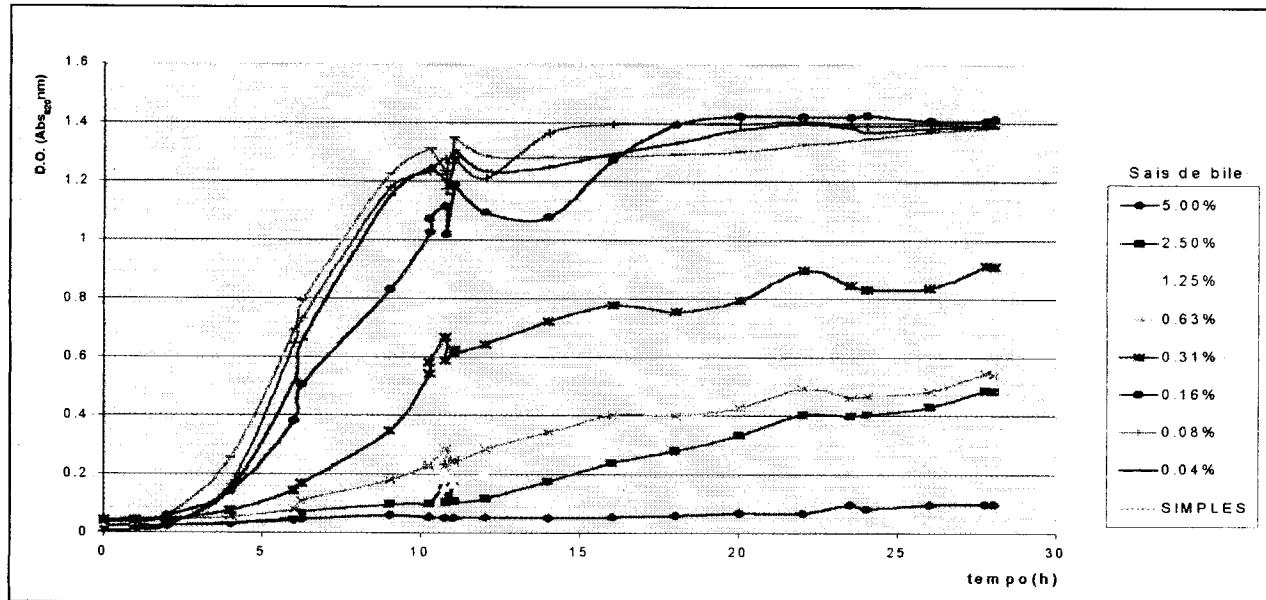


Figura 4: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 2571^T a sais de bile.

Comparativamente, o comportamento das 3 linhagens a 0.3% de sais de bile, concentração definida para os ensaios de resistência das 41 linhagens, é mostrado na Figura 5 e Tabela 2, verificando-se uma maior resistência da linhagem CCT 2571^T e um comportamento de maior inibição e estatisticamente idêntico das linhagens CCT 1053 e CCT 1400.

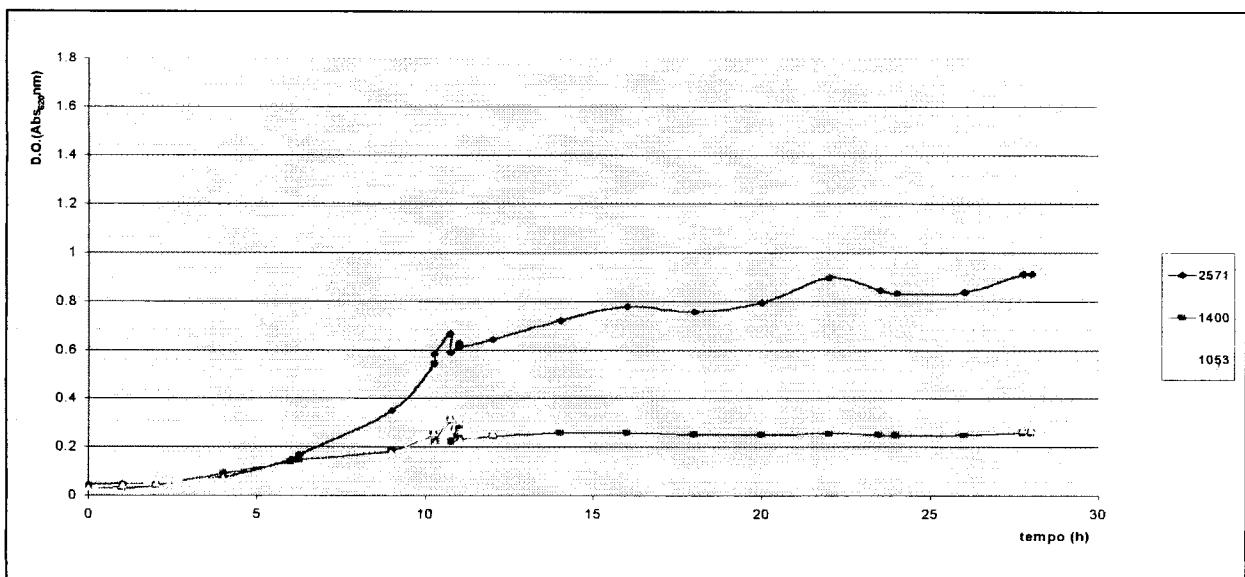


Figura 5: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a 0.31% de sais de bile.

Tal como observado na Figura 4, os valores de 1- Δt da linhagem CCT 2571^T (Tabela 2), demonstram que esta foi a mais resistente das três linhagens testadas, nas concentrações de sais de bile acima de 0.31%, obtendo-se crescimentos até para concentrações de 2.5% de sais de bile no meio.

Para diferenciar tanto as 3 linhagens quanto os tratamentos com diferentes concentrações de sais de bile (Tabela 2), foi realizada análise estatística dos dados sob o delineamento fatorial (GOMES, 1987). Estatisticamente não foi observada diferença significativa entre as linhagens nos tratamentos de 0.04 a 0.08 e 0.16% de sais de bile.

Tabela 2: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a sais de bile, valores 1- Δt .

Linhagem	Concentração (%)							
	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04
1053	N	N	N	N	0.65	B	AB	A
	c	c	c	c	B	ab	a	a
1400	N	N	N	N	0.62	0.84	0.97	0.85
	c	c	c	c	b	ab	a	a
2571 ^T	N	0.185	0.435	0.61	0.79	A	A	A
	d	d	c	bc	ab	a	a	a

A. Resultado teste de Tukey ($P<0,05$) entre as linhagens.
 b. Resultado teste de Tukey ($P<0,05$) entre as concentrações de Bile testadas
 valor. Crescimento positivo.
 N. Ausência de crescimento.

A concentração de sais de bile a 0.31%, por estar estatisticamente distinta das demais concentrações testadas e por permitir a diferenciação do crescimento das linhagens teste, foi definida para o ensaio de resistência a sais de bile das outras 38 linhagens, ficando os valores de 1- Δt das linhagens teste como controles positivos.

4.1.2. Ensaio cinético de resistência a sais de bile em microplacas

4.1.2.1. Determinação de $1-\Delta t$

Os resultados de resistência a sais de bile, valores de $1-\Delta t$, apresentados nas tabelas 5 e 6 representam os valores médios ($P<0,05$) de quatro ensaios distintos das linhagens testadas, seguindo-se as metodologias descritas em 3.3.2 e 3.4.1.

Para uma melhor visualização das semelhanças entre as linhagens, os dados foram ordenados na tabela 5 segundo a resistência estatisticamente definida (GOMES, 1987).

Verifica-se uma pequena dispersão dos valores, estando 33 linhagens estatisticamente idênticas ao maior valor (CCT 4775) e 35 linhagens com média idêntica à linhagem menos resistente (CCT 1417).

Das 32 linhagens mais resistentes, 6 linhagens (CCT 4775, 4803, 4403, 1024, 1025 e 4398) foram consideradas as mais resistentes por estarem significativamente distantes das 35 linhagens menos resistentes.

Com exceção da linhagem CCT 4802, todas as linhagens utilizadas comercialmente como probióticos (CCT 4775 e 4803) encontram-se entre as 6 mais resistentes a sais de bile, constatando-se que provavelmente esta tenha sido uma característica relevante para a seleção das mesmas.

As linhagens CCT 1024 e 1025 originaram-se de caldo-de-cana coletado antes da passagem em torre de resfriamento, a linhagem CCT 4403 de melaço fermentado e a linhagem CCT 4398 foi primeiramente isolada em saliva humana (FTPT, 1996).

Com relação aos controles propostos na definição da dosagem de sais de bile (CCT 1053, 1400 e 2571^T), somente a linhagem CCT 1400 apresentou variação, mostrando-se bem menos resistente do que o esperado, face aos testes preliminares.

Tabela 3: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a sais de bile, valores de 1-Δt e comparação estatística pelo teste de Duncan (P<0.05).

Linhagem	1-Δt	
4775	1.09	a
4803	1.02	a b
4403	0.91	a b c
1024	0.90	a b c d
1025	0.87	a b c d e
4398	0.85	a b c d e
2571^T	0.83	a b c d e f
4402	0.81	a b c d e f
559	0.80	a b c d e f
3434	0.80	a b c d e f
1021	0.77	a b c d e f
1006	0.75	a b c d e f
4802	0.75	a b c d e f
1414	0.74	a b c d e f
1410	0.73	a b c d e f
1019	0.73	a b c d e f
4404	0.70	a b c d e f
1412	0.70	a b c d e f
1397	0.70	a b c d e f
1384	0.69	a b c d e f
1467	0.66	a b c d e f
1405	0.62	a b c d e f
1409	0.60	a b c d e f
1407	0.59	a b c d e f
1048	0.59	a b c d e f
1387	0.58	a b c d e f
4420	0.57	a b c d e f
1398	0.55	a b c d e f
1029	0.54	a b c d e f
1465	0.53	a b c d e f
845	0.53	a b c d e f
1053	0.51	a b c d e f
1022	0.48	b c d e f
1415	0.37	c d e f
1400	0.37	c d e f
1385	0.36	c d e f
1055	0.33	c d e f
1016	0.30	d e f
1406	0.30	d e f
1399	0.28	e f
1417	0.22	f

a Resultado teste de Duncan (P<0.05) na concentração de Bile testada

4.1.2.2. Determinação de 1- μ %

O cálculo dos valores de 1- μ % foi realizado conforme descrito em 3.4.2 partindo-se dos mesmos ensaios utilizados para a obtenção dos valores de 1- Δt .

As respostas obtidas com o cálculo de 1- μ % das linhagens, ao contrário dos valores calculados de 1- Δt , mostram uma dispersão um pouco maior, existindo um menor número de linhagens com resultados semelhantes (tabela 4).

Das linhagens testadas, 20 apresentaram comportamento estatisticamente idêntico à linhagem mais resistente (CCT 4802) e 29 à linhagem menos resistente (CCT 1467).

Por esse método, 12 linhagens (CCT 1006, 1024, 1385, 1399, 1406, 2571^T, 4402, 4403, 4404, 4775, 4802 e 4803) foram consideradas as mais resistentes, estando contidas neste grupo, 4 das 6 linhagens consideradas resistentes pelo método de 1- Δt .

Três linhagens muito pouco resistentes no método 1- Δt (CCT 1406, 1399 e 1385) foram consideradas resistentes pelo método de 1- μ %. As três linhagens foram isoladas de caldo-de-cana fermentado sendo fraca (CCT 1406 e 1385) e altamente (CCT1399) floculentas (FTPT, 1996; SANTOS, 1991).

As três novas linhagens aqui selecionadas como resistentes aos sais de bile (CCT 1006, 2571^T e 4402) foram isoladas de caldo-de-cana de torre de resfriamento, beterraba e melão fermentados, respectivamente (FTPT, 1996).

Tabela 4: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a sais de bile, valores de 1- $\mu\%$ e comparação estatística pelo teste de Duncan ($P<0.05$).

	1- $\mu\%$
4802	1.13 a
4775	1.01 a b c
1024	0.99 a b c
4404	0.97 a b c
1406	0.96 a b c d
4803	0.96 a b c d
1399	0.93 a b c d
4403	0.89 a b c d e
2571 ^T	0.88 a b c d e f
4402	0.85 a b c d e f
1006	0.83 a b c d e f
1385	0.81 a b c d e f
1025	0.80 a b c d e f g
1398	0.78 a b c d e f g
1409	0.74 a b c d e f g
1384	0.71 a b c d e f g
1400	0.71 a b c d e f g
1387	0.71 a b c d e f g
4420	0.71 a b c d e f g
1029	0.69 b c d e f g
1021	0.69 b c d e f g
1397	0.67 b c d e f g
3434	0.67 b c d e f g
1019	0.66 b c d e f g
1415	0.63 b c d e f g
1016	0.63 b c d e f g
559	0.63 b c d e f g
1407	0.62 c d e f g
1414	0.62 c d e f g
1053	0.61 c d e f g
1048	0.61 c d e f g
1022	0.61 c d e f g
1405	0.61 c d e f g
845	0.59 c d e f g
1055	0.54 d e f g
4398	0.50 e f g
1417	0.50 e f g
1412	0.50 e f g
1410	0.46 f g
1465	0.38 g
1467	0.38 g

a Resultado teste de Duncan ($P<0.05$) na concentração de Bile testada

Correlacionando-se os valores de $1-\Delta t$ e $1-\mu\%$ obtidos (Figura 6), observa-se um r de 0.593, mostrando que os testes tem relação apenas parcial.

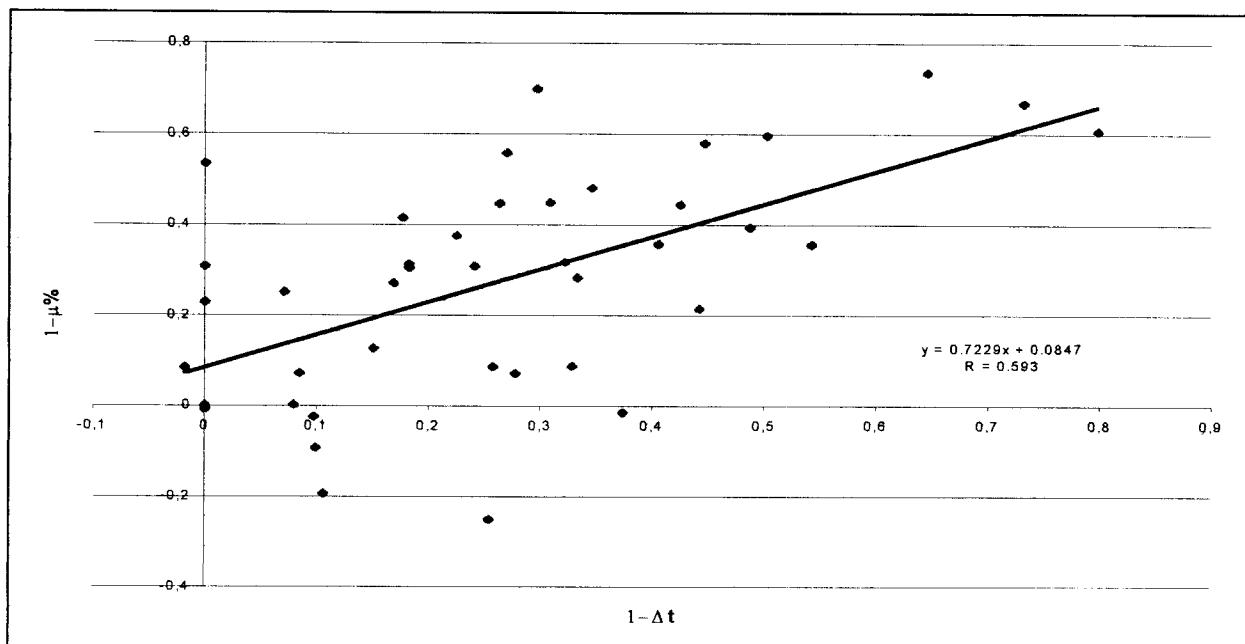


Figura 6.: Seleção para resistência a sais de bile das 42 linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus*, correlação entre os resultados de $1-\Delta t$ e $1-\mu\%$.

4.1.3. Ensaios em placas de Petri

O ensaio em placas apresentou uma pequena discriminação das linhagens quanto a resistência, já que das 41 linhagens, somente 10 não cresceram nas três concentrações de bile testadas (0.3, 0.6 e 1.5%). Das 7 linhagens consideradas resistentes pelo método proposto $1-\Delta t$, nenhuma demonstrou inibição no ensaio em placas, mas quanto ao método baseado na velocidade específica de crescimento, uma linhagem (CCT 1406) apontada entre as 13 mais resistentes não cresceu no ensaio em placas.

Tabela 5: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* aos sais de bile, resultados do teste de resistência a três concentrações de bile em placas de Petri.

Linhagens	Bile		
	0.3	0.6	1.5
559	S	S	N
845	N	N	N
1006	S	N	N
1016	S	S	S
1019	N	N	N
1021	S	S	S
1022	S	S	S
1024	S	S	S
1025	S	S	N
1029	S	S	S
1048	S	S	S
1053	S	S	S
1055	S	S	S
1384	N	N	N
1385	S	S	S
1387	N	N	N
1397	S	S	S
1398	S	N	N
1399	S	N	N
1400	N	N	N
1405	N	N	N
1406	N	N	N
1407	N	N	N
1409	N	N	N
1410	S	N	N
1412	S	S	S
1414	N	N	S
1415	S	S	S
1417	S	S	N
1465	S	N	N
1467	S	N	N
2571 ^T	S	S	S
3434	S	S	S
4398	S	N	N
4402	S	S	S
4403	S	N	N
4404	S	S	S
4420	S	N	N
4775	S	S	N
4802	S	S	N
4803	S	S	N

S. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.2. Determinação da resistência a antibióticos em microplacas

4.2.1. Definição das concentrações inibitórias de antibióticos

As figuras 7, 8 e 9 ilustram o ensaio de dose mínima inibitória do crescimento pelos antibióticos virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn para uma das linhagens em estudo (CCT 2571^T), podendo-se distinguir duas regiões de inibição nas concentrações de virginiamicina de 6ppm, de colistina de 60ppm e de bacitracina de Zn de 30ppm.

Nas dosagens abaixo de 6ppm para virginiamicina, 60ppm para colistina e 30ppm para bacitracina de Zn observa-se um crescimento normal.

Acima dessas concentrações verifica-se uma grande inibição do crescimento da linhagem, caracterizada tanto por um crescimento diminuto ou ausente, quanto por uma fase lag da ordem de até 15h (figuras 7, 8 e 9), superior àquela observada sem inibição.

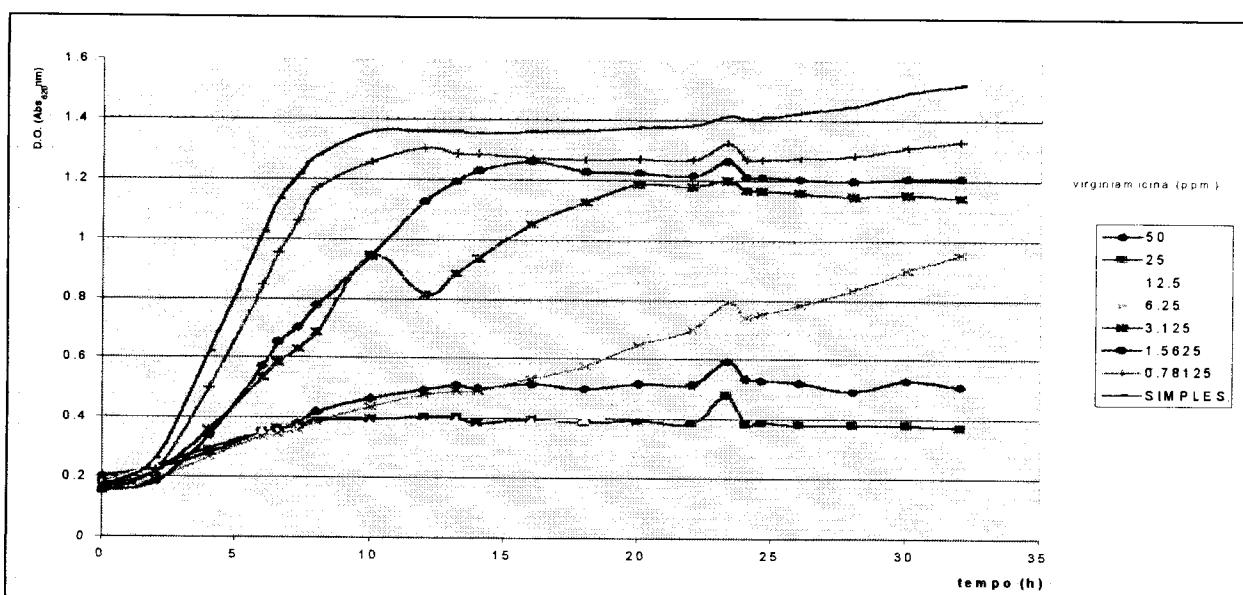


Figura 7: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 2571^T à virginiamicina.

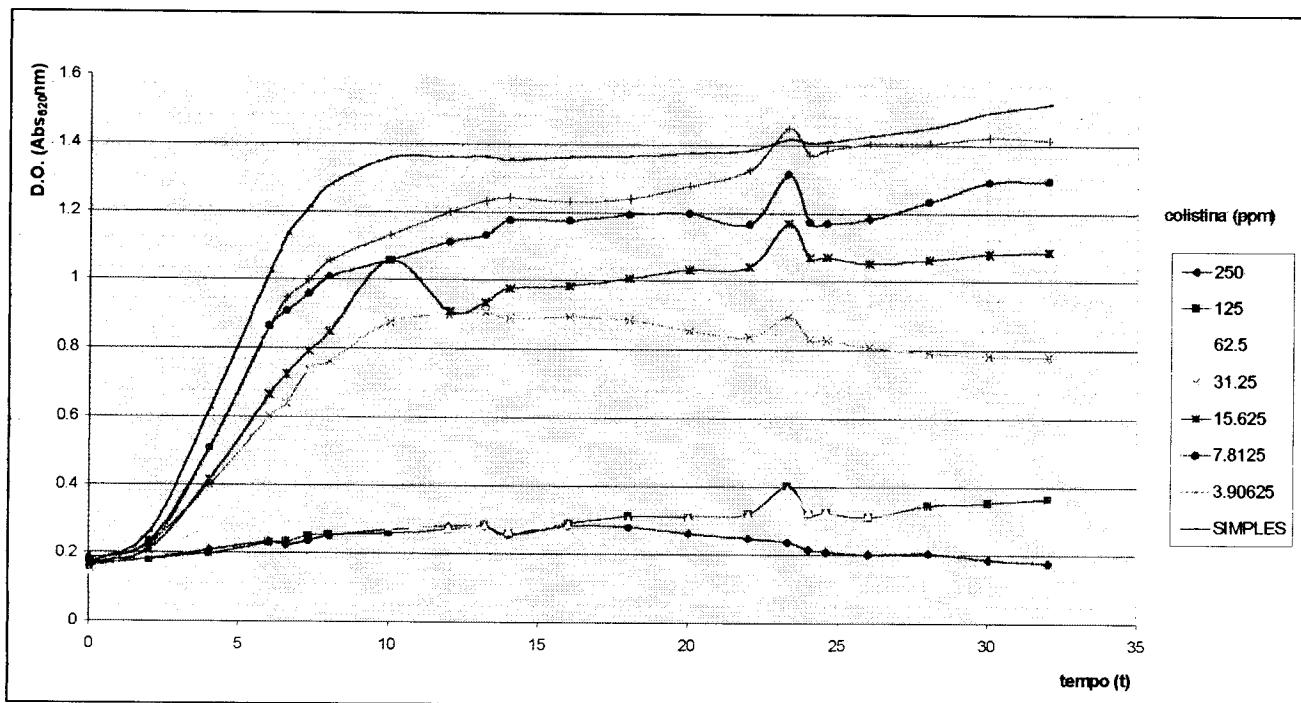


Figura 8: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 2571^T à colistina.

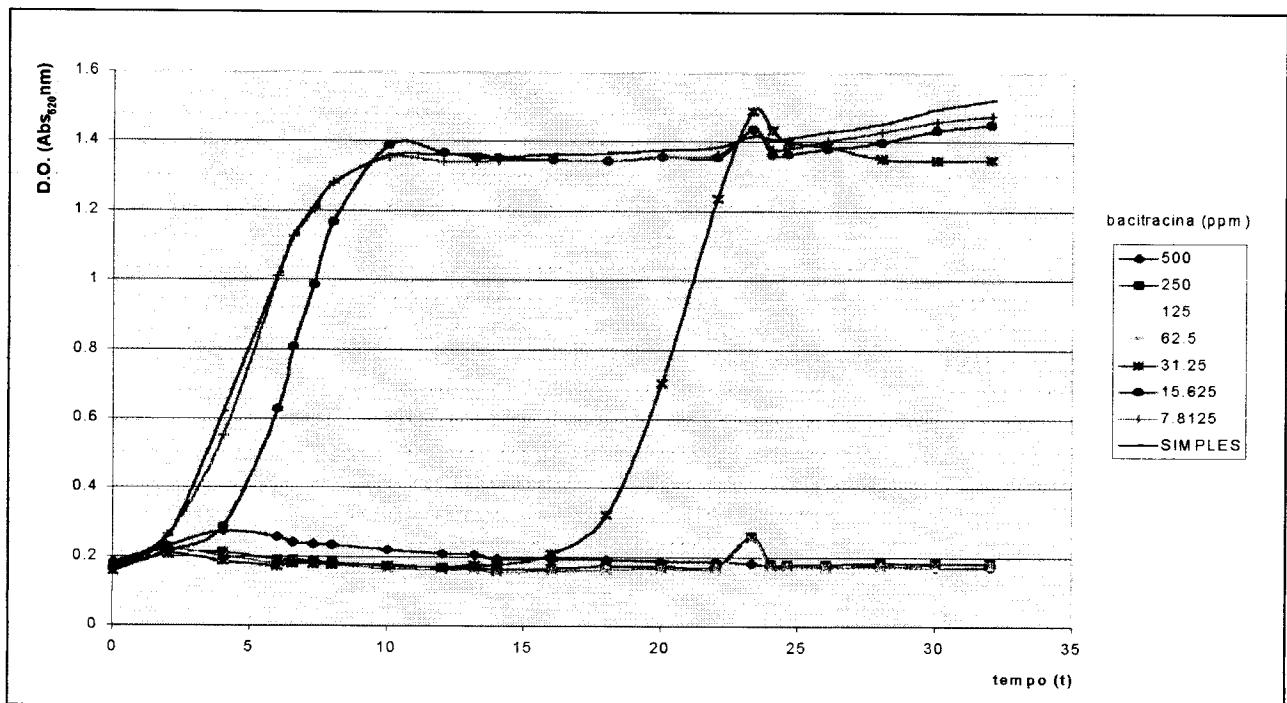


Figura 9: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 2571^T à bacitracina de Zn.

As figuras 10, 11 e 12 ilustram o comportamento das três linhagens teste nas concentrações de antibióticos definidas para a avaliação da resistência das demais linhagens. No caso da virginiamicina definiu-se a concentração de 0.7ppm para o teste com as demais 38 linhagens de lactobacilos em teste. Para a colistina e bacitracina de Zn, escolheu-se a concentração de 50ppm.

Face à proximidade dos valores de Dose Mínima Inibitória expostos na Tabela 3 com os dados de DUTTA e DEVRIESE (1981) optou-se por escolher as dosagens de antibióticos citadas na literatura, estabelecendo-se assim um padrão externo de comparação.

Assinala-se que, no entanto, trabalhou-se em uma faixa mais estreita de resistência, na qual pelo menos duas das linhagens teste cresceram.

Neste caso observa-se que a linhagem teste CCT 1053 não apresentou crescimento perceptível na dosagem de colistina e bacitracina de Zn testadas (figuras 10 e 11) e a linhagem CCT 1400 não apresentou crescimento perceptível na dosagem de virginiamicina e um crescimento mínimo na de bacitracina de Zn testadas (figuras 11 e 12).

Somente a linhagem CCT 2571^T, apresentou-se resistente às dosagens sugeridas pela literatura, apesar de ter demonstrado na presença de bacitracina de Zn um tempo de indução maior (15h) do que o comum.

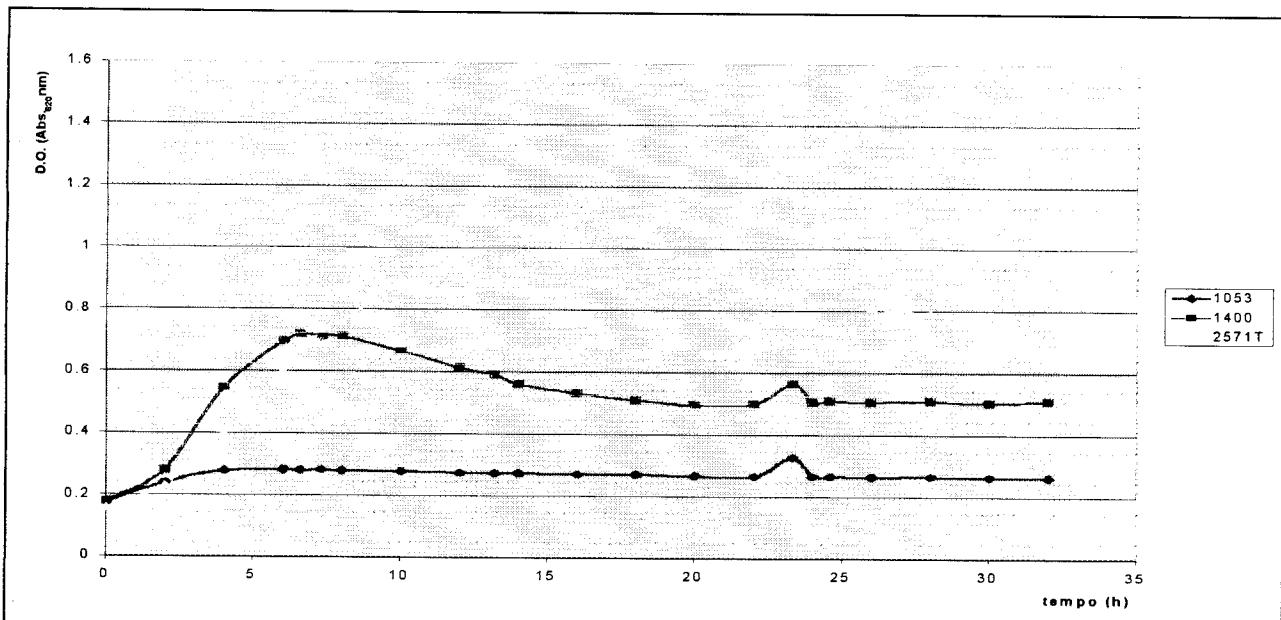


Figura 10: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a 30ppm de colistina.

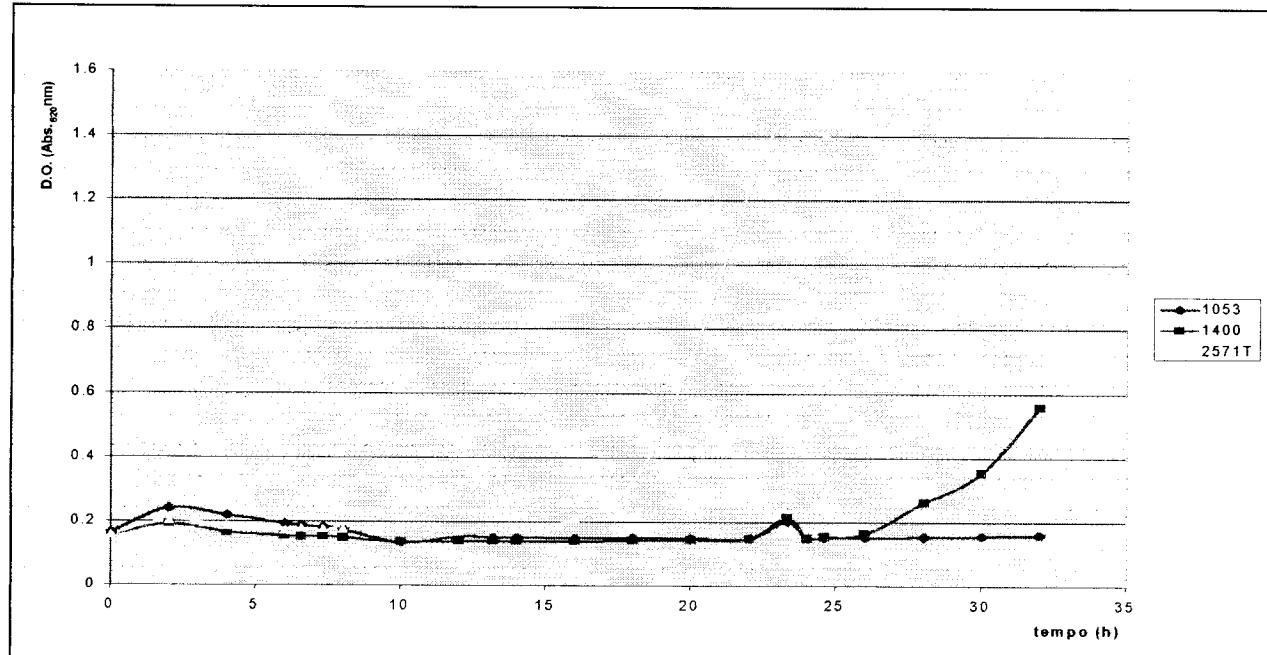


Figura 11: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a 30ppm de bacitracina de Zn.

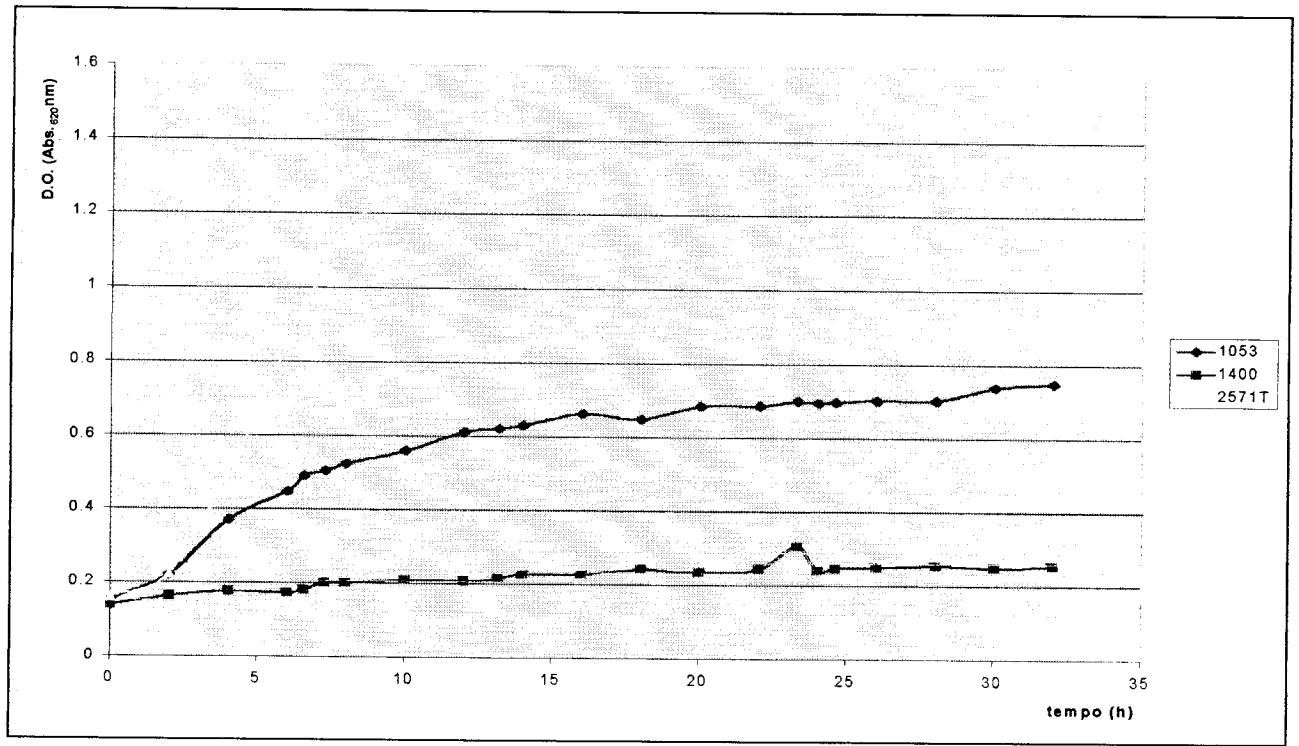


Figura 12: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a 0.7ppm de virginiamicina.

Na Tabela 6 estão sistematizados os resultados obtidos para as três linhagens teste quanto a resistência aos antibióticos.

Observa-se que há uma maior tolerância das linhagens teste à bacitracina de Zn e colistina face à necessidade de maiores dosagens dos antibióticos para a inibição das linhagens.

Tal qual observado na Figura 7, também se verifica na Tabela 6 que há uma maior inibição da linhagem CCT 2571^T numa concentração de virginiamicina menor (12.5ppm) do que a concentração mais alta utilizada (50ppm), indicando uma grande variação das respostas nas concentrações de maior inibição.

Tabela 6: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a bacitracina de Zn, virginiamicina e colistina, valores de 1-Δt.

Inibidor	linhagem	Concentração (ppm)							
		500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.9
Bacitracina de Zn	1053	N	N	N	N	N	N	0.88	0.95
	1400	N	N	N	N	-0.01	0.09	0.55	0.95
	2571^T	N	N	N	N	0.21	0.77	0.94	1.03
Virginiamicina	Concentração (ppm)								
		50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
	1053	N	N	N	N	N	0.16	0.7	0.84
	1400	N	N	N	N	0.61	0.72	ND	0.94
Colistina	2571^T	0.38	N	0.12	0.45	0.76	0.78	0.91	0.97
	Concentração (ppm)								
		250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95
	1053	N	N	N	N	0.52	0.84	0.88	0.99
	1400	N	0.28	0.73	0.94	0.96	0.97	1.04	1.03
	2571^T	N	N	N	0.82	0.83	0.9	0.91	0.99

valor. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.2.2. Ensaios cinéticos de resistência à colistina, virginiamicina e bacitracina de Zn

4.2.2.1.Determinação de 1-Δt

Analisou-se os resultados dos crescimentos das 41 linhagens em caldo MRS contendo 0.7ppm de virginiamicina, e 50ppm de colistina e bacitracina de Zn, segundo os itens 3.3.3 e 3.4.1.

Os resultados de 1-Δt apresentados (Tabela 7) representam o valor de um único ensaio das linhagens.

para colistina acima de 0.5 (CCT1024, 1025, 1053, 1398, 2571, 3434, 4398, 4403, 4404, 4775, 4803); e somente uma linhagem resistente à bacitracina de Zn (CCT4402).

As linhagens de probióticos comerciais, usadas como padrão (CCT 4775, 4802 e 4803) não apresentaram-se resistentes à virginiamicina e bacitracina de Zn, mas as linhagens CCT 4775 e 4803 apresentaram resistência à colistina.

Avaliando-se as linhagens teste (CCT 1053, 1400 e 2571^T), verifica-se que houve uma não conformidade entre os resultados obtidos neste ensaio e o que era esperado no caso da virginiamicina devido aos testes preliminares. Com as linhagens apresentando valores de 1-Δt abaixo da expectativa para CCT 1053 e 2571^T e acima do esperado para a linhagem CCT 1400.

Como na reativação para o teste de resistência as mesmas cresceram junto às outras 38 linhagens, possivelmente as linhagens teste tiveram condições de reativação mais adversas, maximizando o efeito dos inibidores.

No teste de inibição com colistina os resultados com as linhagens teste foram os esperados, no entanto, a linhagem CCT 1053, que não havia crescido anteriormente, mostrou-se mais resistente.

A dosagem mínima de bacitracina de Zn utilizada foi superestimada e nenhuma consideração pôde ser feita sobre a resistência das linhagens. Os resultados apontam claramente que as dosagens entre 50 e 100ppm, listadas em literatura (DUTTA e DEVRIESE, 1981) não são adequadas para ensaios cinéticos de resistência.

Tabela 7: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn, valores de 1-Δt.

Linhagem	Virginiamicina	Colistina	Bacitracina
	1-Δt	1-Δt	1-Δt
559	0.41	0.37	N
845	0.37	0.22	N
1006	0.52	0.43	N
1016	N	0.46	N
1019	0.06	0.46	N
1021	0.83	0.43	N
1022	0.62	0.34	N
1024	N	0.74	N
1025	N	0.71	N
1029	N	0.48	N
1048	N	0.27	N
1053	N	0.51	N
1055	0.20	0.42	N
1384	0.45	N	N
1385	0.48	N	N
1387	N	N	N
1397	0.71	N	N
1398	0.87	0.71	N
1399	N	0.35	N
1400	0.49	0.39	N
1405	0.32	0.33	N
1406	0.70	0.56	N
1407	N	0.37	N
1409	N	N	N
1410	N	N	N
1412	0.49	0.51	N
1414	0.49	N	N
1415	N	N	N
1417	N	N	N
1465	0.39	0.29	N
1467	0.45	0.40	N
2571	0.48	0.62	N
3434	0.63	0.70	N
4398	0.58	0.74	N
4402	0.01	N	0.24
4403	N	0.56	N
4404	0.25	0.72	N
4420	N	N	N
4775	0.10	0.77	N
4802	N	0.50	N
4803	N	0.77	N

valor. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.2.2.2. Determinação de 1- μ %

Os valores de 1- μ % das linhagens encontram-se listados na Tabela 8 e a correlação entre os resultados de 1- μ % com 1- Δt pode ser visualizada nas Figuras 13 e 14 ($r=0.8$ para virginiamicina e 0.4 para colistina).

Os resultados obtidos para 1- μ % confirmam a resistência atribuída às linhagens pelo método 1- Δt (item 3.4.1.) e a resistência de somente uma linhagem à bacitracina de Zn.

Os resultados de virginiamicina e colistina apresentados demonstram claramente que a escolha das dosagens utilizadas foi correta. Verificou-se que com as dosagens utilizadas houve uma ótima distribuição de linhagens suscetíveis e resistentes aos antibióticos.

Os resultados de inibição das linhagens com bacitracina de Zn, por outro lado, só permitiu verificar a linhagem mais resistente, fato que ocorre normalmente nos ensaios de resistência onde dosagens discriminatórias de inibidores são utilizadas.

O uso de doses sub letais em microplacas ilustra o conjunto das linhagens de forma mais realista e completa, contribuindo para a eliminação de dúvidas quanto ao não crescimento de certas linhagens, já que como pode ser visto nas Tabelas 7 e 8, praticamente todas as linhagens apresentam algum tipo de crescimento que é diretamente proporcional à resistência da linhagem ao inibidor.

O que se verifica no teste em placas (Tabela 9) é uma contribuição a essa afirmativa já que somente uma linhagem cresceu nas placas contendo virginiamicina e bacitracina de Zn e algumas linhagens consideradas resistentes no ensaio cinético não demonstraram crescimento nas placas.

Tabela 8: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn, valores de 1- $\mu\%$.

Linhagem	Virginiamicina 1- $\mu\%$	Colistina 1- $\mu\%$	Bacitracina 1- $\mu\%$
559	0.5	0.56	N
845	0.19	0.67	N
1006	0.59	0.51	N
1016	0.87	1.02	N
1019	N	0.57	N
1021	0.78	0.64	N
1022	0.77	1.22	N
1024	0.85	1.08	N
1025	0.77	0.33	N
1029	0.7	0.43	N
1048	0.87	0.24	N
1053	0.78	0.47	N
1055	0.23	0.66	N
1384	0.47	0.67	N
1385	0.54	0.82	N
1387	0.79	1.37	N
1397	0.71	0.83	N
1398	0.71	0.81	N
1399	0.78	N	N
1400	0.59	1.04	N
1405	0.55	1.16	N
1406	0.7	N	N
1407	0.67	0.79	N
1409	0.8	0	N
1410	0.53	0	N
1412	0.63	1.11	N
1414	0.71	0	N
1415	0.98	0.54	N
1417	0.96	0	N
1465	0.53	1.31	N
1467	0.73	0.94	N
2571 ^T	0.74	0.92	N
3434	0.83	0.6	N
4398	0.62	0.43	N
4402	0.09	0	0.68
4403	0.76	0.64	N
4404	0.21	0.57	N
4420	0.97	0	N
4775	0.22	0.82	N
4802	0.08	1.82	N
4803	0.4	1.75	N

valor. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

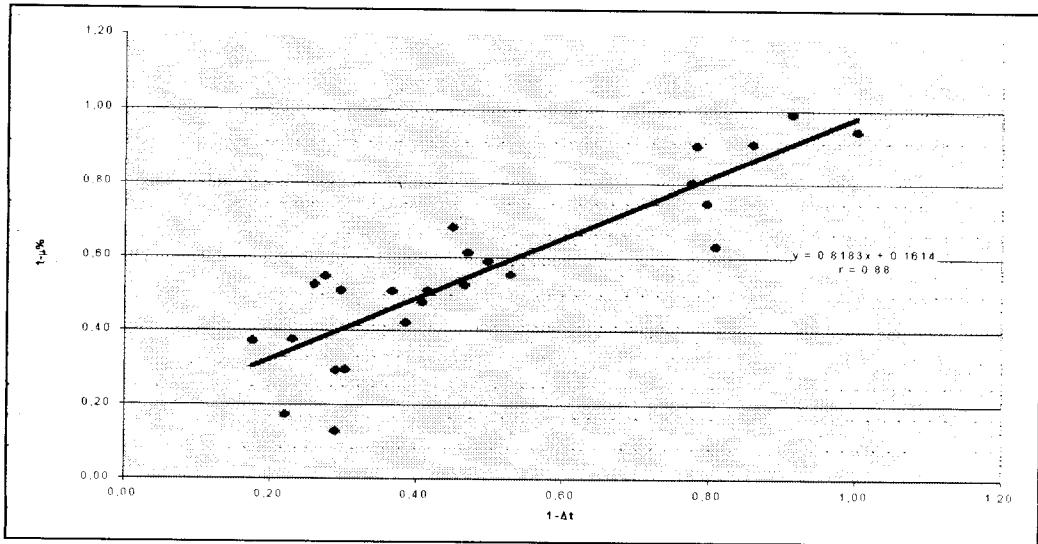


Figura 13: Seleção para resistência à virginiamicina das 42 linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus*, correlação entre os resultados de $1-\Delta t$ e $1-\mu\%$.

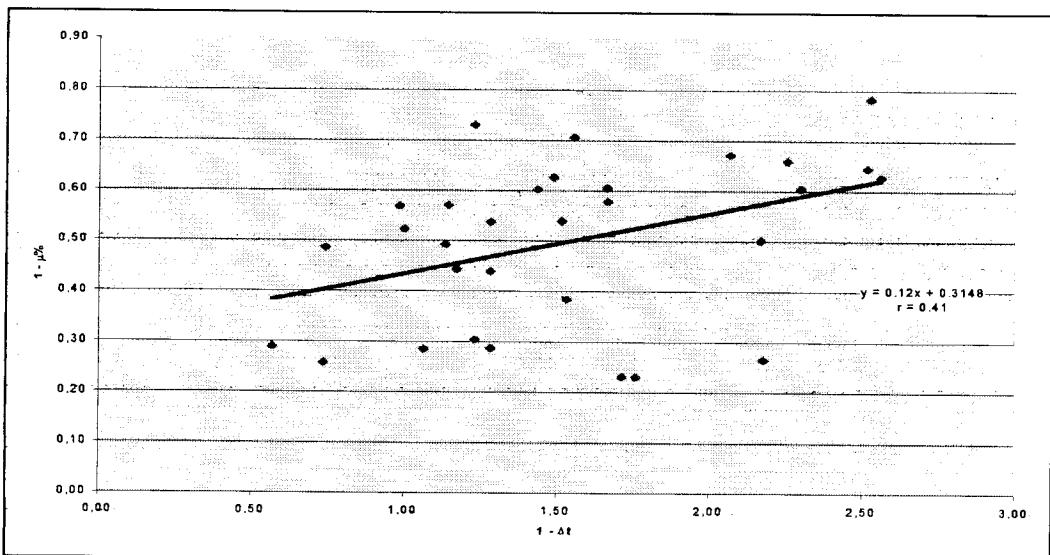


Figura 14: Seleção para resistência à colistina das 42 linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus*, correlação entre os resultados de $1-\Delta t$ e $1-\mu\%$.

Tabela 9: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* à virginiamicina, colistina e bacitracina de Zn resultados dos testes em placas de Petri.

Linhagem	Virginiamicina	Colistina	Bacitracina
559	NI	NI	NI
845	NI	NI	NI
1006	NI	NI	NI
1016	NI	NI	NI
1019	NI	NI	NI
1021	N	S	N
1022	N	S	N
1024	N	S	N
1025	N	S	N
1029	N	S	N
1048	N	S	N
1053	N	S	N
1055	N	S	N
1384	N	S	N
1385	N	S	N
1387	N	N	N
1397	NI	NI	NI
1398	NI	NI	NI
1399	N	S	N
1400	N	S	N
1405	N	S	N
1406	N	S	N
1407	NI	NI	NI
1409	N	N	N
1410	N	N	N
1412	N	S	N
1414	N	S	N
1415	N	S	N
1417	N	S	N
1465	S	S	N
1467	N	S	N
2571 ^T	N	S	N
3434	N	S	N
4398	N	S	N
4402	N	N	N
4403	N	S	N
4404	N	N	N
4420	N	N	N
4775	N	N	N
4802	N	N	N
4803	N	N	N

S. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

NI. Linhagem não inoculada.

4.3. Determinação da resistência a pH ácidos em microplacas

4.3.1. Definição da Concentração de pH inibitória

A capacidade das linhagens em teste resistirem a baixos valores de pH pode ser visualizada nas Figuras 15, 16 e 17 e na Tabela 4.

Observa-se a baixa resistência das linhagens teste às concentrações de íons H do meio, caracterizado pelo crescimento das linhagens CCT 1053, 1400 e 2571^T somente nos meios de pH 5.0 e 6.4 (meio simples).

Assinala-se que mesmo sem a definição das linhagens teste como controle positivo, optou-se por definir o pH 3.0 como padrão para as demais linhagens por estar mais próximo ao valor do pH do estômago (pH 2.0 – 3.0), (EWING e COLE, 1994; MITSUOKA, 1978, 1989).

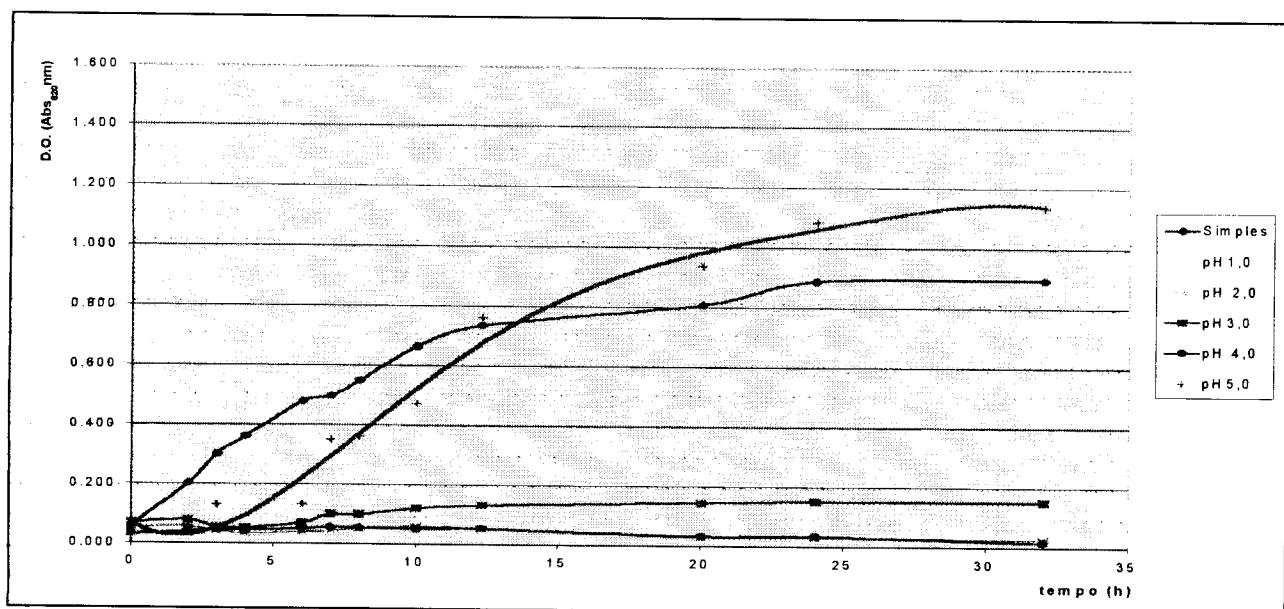


Figura 15: Resistência de *Lactobacillus fermentum* linhagem CCT 1053 a pH baixos.

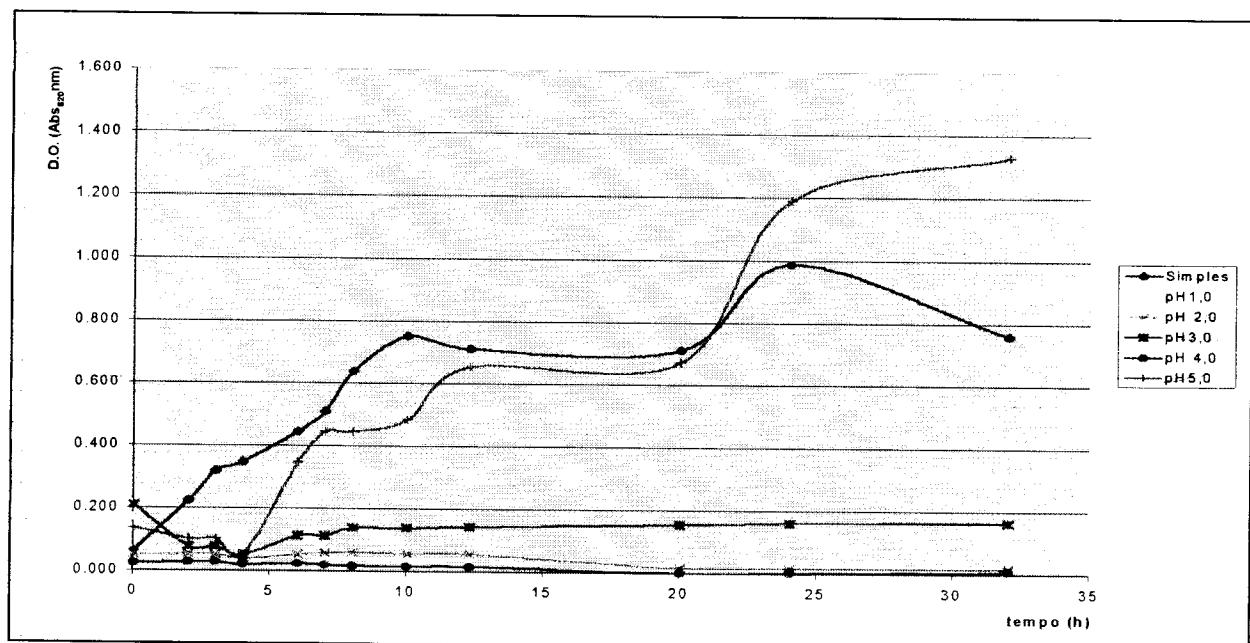


Figura 16: Resistência de *Lactobacillus fermentum* linhagem CCT 1400 a pH baixos.

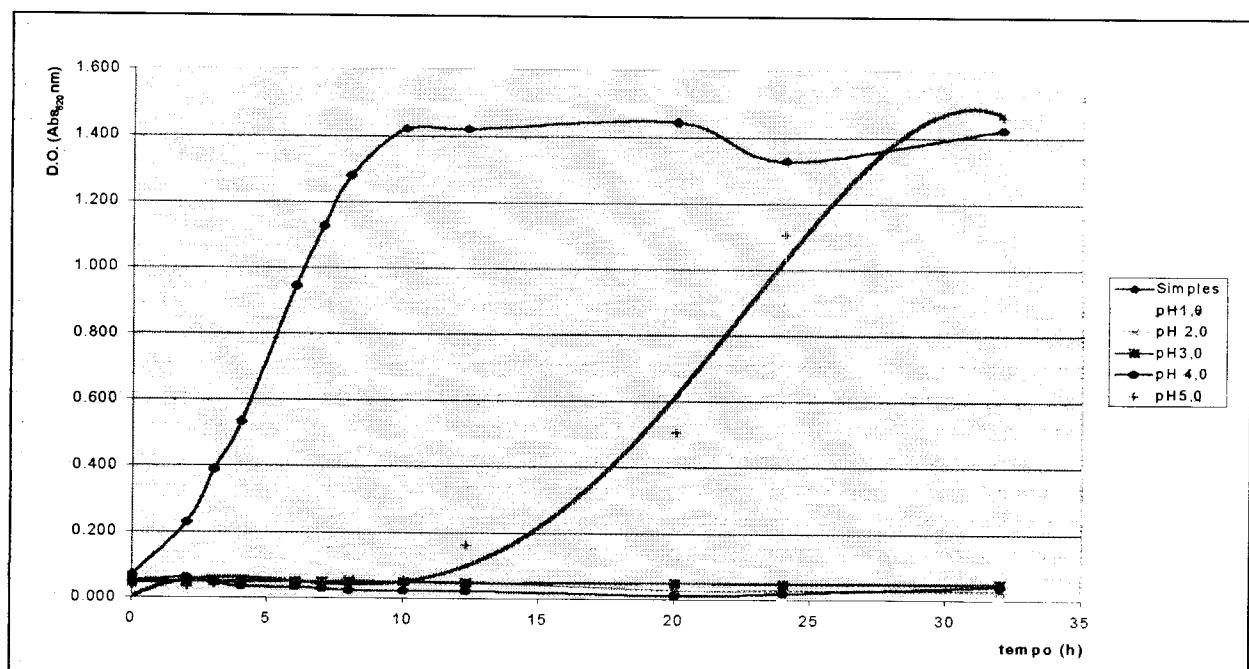


Figura 17: Resistência de *Lactobacillus fermentum* linhagem CCT 2571^T a pH baixos.

Tabela 10: Resistência de *Lactobacillus fermentum* CCT 1053, 1400 e 2571^T a bajhos valores de pH, valores de 1-Δt.

Linhagem	pH				
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
1053	N	N	N	N	0.948
1400	N	N	N	N	1.01
2571 ^T	N	N	N	N	0.79

valor. Crescimento positivo.
N. Ausência de crescimento.

4.3.2. Ensaio cinético de resistência a pH ácido

4.3.2.1. Determinação de 1-Δt

O cálculo de 1-Δt foi realizado analisando-se os resultados dos crescimentos das 41 linhagens em caldo MRS a pH3.0, segundo os itens 3.3.4 e 3.4.1.

Os resultados de 1-Δt apresentados (Tabela 11) representam o valor de um único ensaio das linhagens.

Somente 5 linhagens apresentaram resultados positivos de crescimento, das quais três permaneceram com valores de 1-Δt acima de 0.5 (CCT 1024, 1415, 1417). Dentre as três linhagens, duas (CCT 1415 e 1417) originam-se de ambiente de baixa acidez (caldo-de-cana fermentado pH 4.0). A linhagem CCT 1024 origina-se de ambiente com pH próximo à neutralidade (caldo-de-cana antes da entrada em torre de resfriamento).

Os valores de 1-Δt das outras duas linhagens (CCT 1025, 4398) entretanto, encontravam-se muito próximos aos das demais, considerando-se também essas linhagens resistentes ao tratamento.

Associado ao crescimento na presença de sais de bife e de oxigênio, este foi um parâmetro eliminatório, que orientou a seleção final das linhagens.

Por estar abaixo do limite de pH descrito na literatura para o crescimento dos lactobacilos (AXELLSSON, 1993) os resultados apresentados na Tabela 11 correspondem à expectativa de poucas linhagens apresentarem-se resistentes.

Conforme observado anteriormente na Tabela 10, as linhagens CCT1053, 1400 e 2571^T não apresentaram crescimento a baixos valores de pH.

As linhagens de probióticos comerciais não demonstraram resistência ao pH 3.0 assinalando que durante a seleção o teste de resistência para baixos valores de pH pode ter sido considerado dispensável ou até mesmo que houve uma possível falha de orientação no isolamento e seleção das mesmas.

Como as linhagens comerciais têm o isolamento orientado a aspectos práticos de adesão, com testes *in vivo*, é mais correto supor que a primeira afirmativa seja a verdadeira.

Tabela 11: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a pH 3.0, valores de 1-Δt.

Linhagem	pH3.0
	1-Δt
559	N
845	N
1006	N
1016	N
1019	N
1021	N
1022	N
1024	0.70
1025	0.48
1029	N
1048	N
1053	N
1055	N
1384	N
1385	N
1387	N
1397	N
1398	N
1399	N
1400	N
1405	N
1406	N
1407	N
1409	N
1410	N
1412	N
1414	N
1415	0.65
1417	0.51
1465	N
1467	N
2571 ^T	N
3434	N
4398	0.46
4402	N
4403	N
4404	N
4420	N
4775	N
4802	N
4803	N

valor. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.3.2.2. Determinação de 1- μ %

Por este método verificou-se crescimento de 21 linhagens a pH 3.0, classificando 18 como resistentes a pH ácido. Todas as 16 linhagens (CCT 1384, 1385, 1387, 1397, 1398, 1399, 1400, 1405, 1406, 1407, 1409, 1410, 1412, 1414, 1415, 1417) originárias de dornas de fermentação de usinas de álcool (pH 3.3-4.1) utilizadas neste trabalho, cresceram a pH 3.0, sendo 14 (CCT 1384, 1385, 1387, 1397, 1398, 1399, 1406, 1407, 1409, 1410, 1412, 1414, 1415, 1417) resistentes (OLIVA NETO, 1990, FTPT, 1996).

Comparativamente, dentre as 10 linhagens (CCT 1006, 1016, 1019, 1021, 1022, 1024, 1025, 1029, 1048, 1053, 1055) isoladas originalmente de torres de refrigeração (pH 6.0) utilizadas neste trabalho, somente 4 (CCT 1024, 1025, 1048, 1053) cresceram a pH 3.0, sendo 2 (CCT 1024, 1025) resistentes a pH ácido (SILVA, 1988, FTPT, 1996).

Somente uma linhagem (CCT 4398) isolada de um organismo vivo manifestou resistência e nenhuma linhagem probiótico cresceu a pH 3.0.

Das 18 linhagens resistentes a pH ácido (CCT 1024, 1025, 1384, 1385, 1387, 1397, 1398, 1399, 1406, 1407, 1409, 1410, 1412, 1414, 1415, 1417, 4398), estão contidas as 5 linhagens classificadas pelo método 1- Δt .

Neste teste novamente se observa uma menor discriminação das linhagens frente ao inibidor em comparação ao método de 1- Δt . Esta distinção entre os dois métodos decorre da avaliação, no cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ da velocidade no ponto de máxima inclinação da curva de crescimento do microrganismo, não considerando o valor de massa celular que o microrganismo produz.

Mesmo nos casos em que o cultivo das linhagens não atingia valores de absorbância de 0.3nm, havia crescimento e uma velocidade a ser determinada e comparada nos meios com e sem o inibidor.

Tabela 12: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a pH 3.0, valores de 1- μ %.

Linhagem	pH3.0
	1- μ %
559	N
845	N
1006	N
1016	N
1019	N
1021	N
1022	N
1024	1.78
1025	0.76
1029	N
1048	0.33
1053	0.45
1055	N
1384	0.65
1385	0.92
1387	1.25
1397	0.67
1398	1.50
1399	1.23
1400	0.34
1405	0.31
1406	0.90
1407	1.02
1409	1.38
1410	0.88
1412	0.60
1414	0.56
1415	0.97
1417	0.86
1465	N
1467	N
2571 ^T	N
3434	N
4398	0.99
4402	N
4403	N
4404	N
4420	N
4775	N
4802	N
4803	N

valor. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.3.3. Ensaios em placas de Petri

Corroborando com o que vem sendo apresentado nos ensaios em placas, os resultados da Tabela 13 também apresentaram-se com correspondência apenas parcial aos valores de $1-\Delta t$ da Tabela 11.

Uma maior exposição dos microrganismos ao oxigênio, ocorrida nas placas, associada a uma quantidade inicial de inóculo baixa aplicada sobre um meio adverso (com agentes inibidores) pode explicar em parte tal ocorrência.

Contribui para esta afirmação o trabalho de SILVA (1988) em que se observou um crescimento lento de 82 linhagens de *Lactobacillus* spp. em superfície de MRS ágar com colônias não atingindo mais do que 1mm de diâmetro.

Dentre essas linhagens, 16 foram aqui testadas, observando-se o mesmo comportamento frente a exposição ao O_2 , o que era esperado tratando-se de um microaerófilo.

Tabela 13: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* a pH 3.0, resultados dos testes em placas de Petri.

Linhagem	pH3.0
559	N
845	N
1006	N
1016	N
1019	N
1021	S
1022	N
1024	S
1025	S
1029	S
1048	N
1053	S
1055	S
1384	N
1385	N
1387	N
1397	N
1398	N
1399	N
1400	N
1405	N
1406	N
1407	N
1409	N
1410	N
1412	N
1414	N
1415	N
1417	N
1465	N
1467	N
2571 ^T	N
3434	N
4398	S
4402	N
4403	N
4404	N
4420	N
4775	N
4802	N
4803	S

S. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.4. Determinação da resistência ao O₂ em microplacas

4.4.1. Determinação de 1-Δt

O cálculo de 1-Δt foi realizado analisando-se os resultados dos crescimentos das 41 linhagens em caldo MRS, cultivado aeróbica e anaerobicamente, segundo os itens 3.3.5 e 3.4.1.

Os resultados de 1-Δt apresentados (Tabela 14) representam o valor de um único ensaio das linhagens.

Das linhagens testadas, as 27 (CCT 559, 1006, 1019, 1021, 1022, 1024, 1025, 1029, 1048, 1053, 1055, 1397, 1400, 1405, 1410, 1412, 1414, 1415, 1417, 1465, 1467, 2571, 3434, 4402, 4403, 4404, 4420) que apresentaram valores de 1-Δt acima de 0.5 e outras 2 linhagens (CCT 1384 e 1407) com valores próximos a 0.5 foram consideradas resistentes ao O₂.

As 3 linhagens probiótico comerciais (CCT 4775, 4802 e 4803) não apresentaram crescimento mas este fato foi decorrente da fraca reativação e posterior morte das linhagens antes do teste.

Tabela 14: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* à presença de O₂ no meio, valores de 1-Δt.

Linhagem	O ₂
559	1.03
845	0.33
1006	0.68
1016	0.45
1019	1.15
1021	0.68
1022	0.97
1024	0.54
1025	0.68
1029	0.67
1048	1.03
1053	0.59
1055	0.89
1384	0.49
1385	N
1387	N
1397	0.88
1398	N
1399	0.36
1400	0.70
1405	0.87
1406	0.42
1407	0.47
1409	N
1410	0.71
1412	0.91
1414	0.73
1415	0.71
1417	0.77
1465	0.87
1467	0.87
2571	0.79
3434	0.70
4398	0.34
4402	0.82
4403	0.81
4404	1.10
4420	0.62
4775	NI
4802	NI
4803	NI

valor. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

NI. Linhagem não inoculada.

4.4.2. Determinação de 1- μ %

A determinação de 1- μ % para testar-se o efeito da presença do O₂ do ambiente no crescimento dos lactobacilos foi o único teste em que se comparou o crescimento das linhagens sob ação do inibidor O₂, com o crescimento sob condições de anaerobiose (item 3.3.5).

A Tabela 15 ilustra que não houve linhagem com valores de 1- μ % maiores do que 0.5 face ao rico crescimento sob condições de anaerobiose. As linhagens cresceram em menor tempo, não sendo possível o registro da variação da densidade ótica de forma completa entre as fases lag e exponencial.

Observa-se, no entanto, que o padrão de resistência permaneceu o mesmo, com as linhagens de maior resistência no método 1-Δt apresentando, em termos relativos, os maiores valores de 1- μ % (Figura-18).

Tal observação contribui positivamente com o que vem sendo observado nos ensaios em placas de Petri, cujos resultados variáveis vêm sendo atribuídos ao maior contato das linhagens com o oxigênio.

Não se definiu nenhuma linhagem resistente à presença do oxigênio com esse método.

Tabela 15: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* à presença de O₂ no meio, valores de 1-μ%.

Linhagem	O ₂
	1-μ%
559	0.34
845	0.13
1006	0.24
1016	0.10
1019	0.24
1021	0.16
1022	0.14
1024	0.09
1025	0.16
1029	0.23
1048	0.26
1053	0.08
1055	0.26
1384	0.09
1385	0.06
1387	0.09
1397	0.31
1398	0.07
1399	0.10
1400	0.09
1405	0.16
1406	0.04
1407	0.12
1409	0.05
1410	0.10
1412	0.23
1414	0.20
1415	0.18
1417	0.20
1465	0.30
1467	0.25
2571 ^T	0.26
3434	0.35
4398	0.08
4402	0.31
4403	0.21
4404	0.34
4420	0.22
4775	NI
4802	NI
4803	NI

valor. Crescimento positivo.
NI. Linhagem não inoculada.

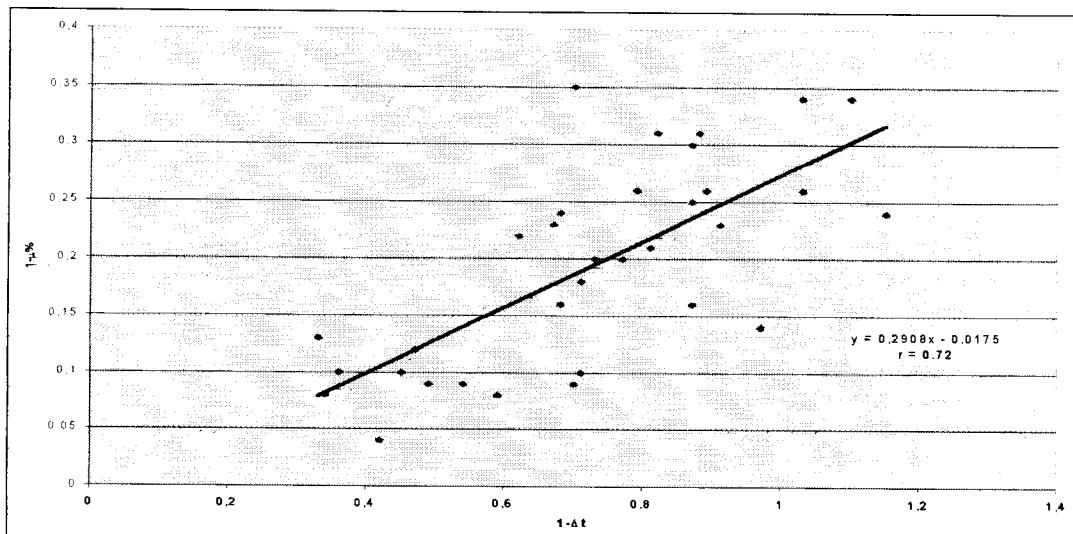


Figura 18.: Seleção para resistência à presença de O₂ das 41 linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus*, correlação entre os resultados de 1-Δt e 1-μ%.

4.4.3. Ensaios em placas de Petri

Também neste caso houve variação nas respostas, com as linhagens apresentando nos ensaios em placas, resultados com correspondência apenas parcial aos valores de 1-Δt e 1-μ% das Tabelas 14 e 15.

A maioria das linhagens cresceu de forma diversa, mas pôde-se testar as linhagens probiótico que, excetuando a linhagem CCT 4802, cresceram na presença de O₂.

Conforme exposto em SILVA (1988), uma maior exposição dos microrganismos ao oxigênio, ocorrida nas placas, em contraponto a baixa dissolução do oxigênio nas microplacas pode explicar em parte tal ocorrência.

Os resultados podem ser observados na tabela 16.

Tabela 16: Resistência de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* ao O₂, resultados dos testes em placas de Petri.

Linhagem	O ₂
559	S
845	S
1006	S
1016	S
1019	S
1021	S
1022	S
1024	S
1025	S
1029	S
1048	S
1053	S
1055	S
1384	S
1385	S
1387	N
1397	N
1398	N
1399	S
1400	S
1405	S
1406	S
1407	N
1409	N
1410	S
1412	S
1414	N
1415	S
1417	S
1465	S
1467	S
2571 ^T	S
3434	S
4398	S
4402	S
4403	S
4404	S
4420	S
4775	S
4802	N
4803	S

S. Crescimento positivo.

N. Ausência de crescimento.

4.5. Análise final dos testes de resistência

Observa-se na tabela 17 a relação de todas as linhagens com padrões de resistência considerados satisfatórios, apresentando valores de $1-\Delta t$ acima de 0.5. Dentre as linhagens listadas, 4 se destacam (CCT 1024,1025, 4398 e 4403) por apresentar resistência aos sais de bile e a pelo menos outros dois testes de resistência. Duas delas se destacam por apresentar resistência a sais de bile, à presença do oxigênio no meio e a dois dos antibióticos testados (CCT 1024,1025). A linhagem CCT4398 se destaca por apresentar resistência a todos os antibióticos testados e a linhagem CCT4403 destaca-se por apresentar resistência aos testes de forma harmônica, crescendo nos meios com sais de bile, oxigênio dissolvido e colistina.

A origem das linhagens pode ser visualizada na tabela 1, podendo-se adiantar que as linhagens CCT 1024 e 1025 foram isoladas de um ponto na entrada da torre de resfriamento de caldo-de-cana de açúcar (SILVA, 1988). A linhagem CCT 4398 é originária de saliva humana e a linhagem CCT 4403 de melaço de cana de açúcar (FTPT,1996). Das três linhagens probiótico, utilizadas como controle positivo, somente duas apresentaram resistência. Entretanto, como a resistência foi a somente dois dos 5 testes realizados (aos sais de bile e à colistina), ambas foram consideradas inaptas pela metodologia aqui definida.

Tabela 17: Linhagens de *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* resistentes a sais de bile, virginiamicina, colistina, pH ácido e presença de oxigênio, resultado final dos testes em microplacas (1-Δt).

Bile	Virginiami- cina	Colistina	pH	O ₂
				559
1006				1006
				1019
1021				1021
1022				1022
1024		1024	1024	1024
1025		1025	1025	1025
				1029
				1048
		1053		1053
				1055
				1384
1397				1397
1398		1398		
				1400
				1405
1406				1407
				1410
				1412
				1414
			1415	1415
			1417	1417
				1465
				1467
		2571		2571
	3434	3434		3434
4398	4398	4398	4398	
				4402
4403		4403		4403
		4404		4404
				4420
4775		4775		
4803		4803		

5. CONCLUSÕES

- A metodologia de Dose Mínima Inibitória adaptada a microplacas, empregada para definir as concentrações de agentes inibidores utilizados nos ensaios cinéticos de resistência mostrou-se eficiente por definir de forma precisa níveis de inibidores que somente diminuem o crescimento dos microrganismos, gerando resultados finais discriminatórios.
- O método mostrou ser dependente da condição fisiológica das linhagens, havendo a necessidade de se sincronizar o crescimento das 41 linhagens mediante três subcultivos em condições ótimas de tensão de O₂ e de temperatura, antes da realização dos testes.
- A metodologia proposta para a análise dos ensaios de resistência cinéticos (1-Δt) mostrou correlação com a de uso corrente (1-μ%) e pode ser recomendada para uma pré seleção de linhagens.
- A metodologia de leitura automática de microplacas permitiu a visualização e comparação do crescimento de praticamente todas as linhagens em estudo, facilitando a seleção de mais linhagens do que o habitual em “screening” *in vitro*.
- A metodologia em placas de Petri utilizada como controle dos resultados de 1-Δt mostrou-se altamente variável, não possibilitando a seleção de nenhuma linhagem.
- Das 41 culturas testadas, 4 linhagens (CCT 1024, CCT 1025, CCT 4398, CCT 4403) apresentaram resistência a praticamente todos os testes de inibição realizados e podem ser recomendadas para testes *in vivo* a fim de se avaliar o potencial probiótico das mesmas.

- Das três linhagens probiótico testadas, duas (CCT 4775 e CCT 4803) não apresentaram resistência a pH ácido e uma (CCT 4802) não apresentou resistência a nenhum dos ensaios realizados, demonstrando uma seleção com mais ênfase aos testes *in vivo* e/ou até mesmo uma falha nos procedimentos de isolamento e seleção.

6. BIBLIOGRAFIA

1. AXELSSON,L.T. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. 1.ED. New York: Marcel Dekker Inc, 1993. cap.1, p.1-63.
2. BIOGAIA BIOLOGICS AB, Walter J. Dobrogosz, Sven E. Lindgren. Method for inhibiting microorganism growth. Int. Cl A01N 063/00, Int. Cl C12N 001/20. US 5439678. 16 mar. 1994; 08 ago. 1995.
3. BLOMBERG,L.; HENRIKSSON,A.; CONWAY,P.L. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, n.1, p.34-39, jan., 1993.
4. BOCHNER,B.R. Sleuthing out bacterial identities. Nature, London, v.339, n.6220, p.157, mai., 1989.
5. BORZANI,W. Cinética de Processos Fermentativos. Revista Brasileira de Engenharia, São Paulo, v.3, n.2, p.01-51, 1986.
6. BRADY,M.S.; KATZ,S.E. In vitro effect of multiple antibiotic/antimicrobial residues on the selection for resistance in bacteria. Journal of AOAC International, Arlington, v.75, n.4, p.738-742, jul., 1992.
7. BRASIL. Portaria Ministerial nº 159, 19 jun. 1992. Dispõe sobre a proibição do uso de certos princípios ativos utilizados em promotores de crescimento e/ou eficiência alimentar e de produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial, União, 23 jun. 1992. 43p.
8. CARNAHAN,A.M.; JOSEPH,S.W.; JANDA,J.M. Species identification of *Aeromonas* strains based on carbon substrate oxidation profiles. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.27, n.9, p.2128-2129, set., 1989.
9. CHATEAU,N.; CASTELLANOS,I.; DESCHAMPS,A.M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. Journal of Applied Bacteriology, London, v.74, n.1, p.36-40, jan., 1993.

10. CHATEAU,N.; DESCHAMPS,A.M.; SASSI,A.H. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology, 18: 42-44, 1994.
11. COSTERTON,J.W.; MARRIE,T.J.; CHENG,K.J. Bacterial Adhesion: Phenomena of bacterial adhesion. 1ED. New York. Plenum Press, 1985. cap.1, p.3-43.
12. DAY,C.A. Competitive exclusion in poultry: a review. Worcestershire: Life Care Products, s.d. 18p.
13. DIFCO. Manual de Bacteriologia: Productos de Bilis. 1978, p. 297.
14. DUNCAN,H.E.; EDBERG,S.C. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. Critical Reviews in Microbiology, Boca-Raton, v.21, n.2, p.85-100, fev., 1995.
15. DUTTA,G.N.; DEVRIESE,L.A. Sensitivity and resistance to growth promoting agents in animal lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, London, v.51, n.1, p.283-288, jan., 1981.
16. DRASAR,B.S.; SHINER,M.; McLEOD,G.M. Studies on the intestinal flora. Gastroenterology, New York, v.56, n.1, p.71-79, jan., 1969.
17. EWING,W.N.; COLE,D.J.A. The Living Gut: An introduction to microorganisms in nutrition. 1ED. Wiltshire. Redwood Books, 1994. cap.2, p.9-28.
18. FERRAZ,L.; FREITAS,E., AUGUSTO,E.F.P., BONOMI,A. Estratégia para cálculo de velocidades em processos fermentativos. Estudos de métodos. In: Workshop da Divisão de Química, 1., São Paulo, IPT, 1995. p.113-116.
19. FREDERICK,M.K.B. Estudo genético, fisiológico e molecular de Lactobacillus fermentum envolvidos na flocação de leveduras. Campinas, 1994. 56p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
20. FULLER,R.; BARROW,P.A.; BROOKER,B.E. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.35, n.3, p.582-591, mar., 1978.

21. FULLER,R. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, London, v.66, n.5, p.365-378, mai., 1989.
22. FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISA E TECNOLOGIA "ANDRÉ TOSELLO" Bacteria: linhagens. Catálogo de Linhagens, Campinas, v.1, n.1, p. 56-57, 1996.
23. GILLILAND,S.E.; SPECK,M.L. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. Journal of Food Protection, Iowa, v.40, n.11, p.760-762, nov., 1977.
24. GILLILAND,S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. Journal of Food Protection, Iowa, v.42, n.2, p.164-167, fev., 1979.
25. GILLILAND,S.E.; STANLEY,T.E.; BUSH,L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. Journal of Dairy Science, Iowa, v.67, n.12, p.3045-3051, dez., 1984.
26. GOMES,F.P. Curso de Estatística Experimental. 12.ED. Piracicaba, SP: Nobel S.A , 1987. 467pp.
27. GORDEN,R.W.; HAZEN,T.C.; FLIERMANS,C.B. Rapid screening for bacteria capable of degrading toxic organic compounds. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v.18, n.4, p.339-347, dez., 1993.
28. GRILL,J.P.; MANGINOT-DÜRR; SCHNEIDER,F.; BALLONGUE,J. Bifidobacteria and Probiotic Effects: Action of *Bifidobacterium* Species on Conjugated Bile Salts. Current Microbiology; New York, v.31, n.7, p.23-27, jul., 1995.
29. HILLMAN,K.; WHITE,A.L.; STEWART,C.S. Dissolved oxygen in the porcine gastrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology, Oxford, v.16, n.6, p.299-302, jun., 1993.
30. HILLMAN,K.; MURDOCH,T.A.; SPENCER,R.J.; STEWART,C.S. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the microflora of the porcine ileum, in an *in vitro* semicontinuous culture system. Journal of Applied Bacteriology, London, v.76, n.3, p.294-300, mar., 1994.

31. HITCHINS,A.D.; McDONOUGH,F.E. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. The American Journal of Clinical Nutrition, New York, v.49, n.4, p.675-684, abr., 1989.
32. HOSE,H.; SOZZI,T. Probiotics, fact or fiction. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Essex, v.51, n.4, p.540-544, abr., 1991.
33. HUIS IN'T VELD,J.H.J.; HAVENAAR,R. Probiotics and health in man and animal. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Essex, v.51, n.4, p.562-567, abr., 1991.
34. KANDLER, O.; WEISS, N. Regular nonsporing Gram-positive rods. In SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. e HOLT, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams e Wilkins, Baltimore, 1986.
35. KATLA,T.; AXELSSON,L. Determination of bacteriocin activity. In: FIFTH SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA, 5. 1996, Veldhoven, Holanda. Abstracts. C10.
36. KAWANISHI; TOSHIO, Matsushiro,A. Tsutsumi,K. Compositions containing lactic acid bacterium *Streptococcus salivarius*. Int. Cl A01N 063/00. US5468479. 26 jun. 1992; 21 nov. 1995.
37. KLAENHAMMER,T.R. Microbiological considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjuncts. Journal of Dairy Science, Champaign, v.65, n.7, p.1339-1349, jul., 1982.
38. LAFOR LABORATORIES LIMITED, Ford,L.C., Micro-encapsulated lactobacilli for medical applications. Int Cl A61K 009/70. US5614209. 13 mar. 1996; 25 mar. 1997.
39. LAFOR LABORATORIES LIMITED, Ford,L.C., Micro-encapsulated lactobacilli for medical applications. Int Cl A61K 009/48. US5633012. 05 apr. 1996; 27 mai. 1997.

40. LEE,M.D.; WOOLEY,R.E.; BROWN,J.; SPEARS,K.R.; NOLAN,L.K.; SHOTTS Jr.,E.B. Comparison of a quantitative microtiter method, a quantitative automated method, and the plate-count method for determining microbial complement resistance. Avian Diseases, Kennett Square, v.35, n.4, p.892-896, out-dez, 1991.
41. MARTEAU,P.; RAMBAUD,J.C. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v.12, n.1/3, p.207-220; set., 1993.
42. MARTEAU,P.; POCHART,P.; BOUHNIK,Y.; RAMBAUD,J.C. The fate and effects of transiting, non pathogenic microrganisms in the human intestine. World Review on Nutrition and Dietetics, Basel, v.74, n.2, p.1-21, jul./dez., 1993.
43. MARSHALL,K.C. Bacterial Adhesion: Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. 1ED. New York. Plenum Press, 1985. cap.6, p.133-156.
44. MARSHALL,V.M. Gut-derived organisms for milk fermentations. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Essex, v.51, n.4, p.548-553, abr., 1991.
45. METAGENICS Inc., Paul,S.M., Bacteria and immunoglobulin-containing composition for human gastrointestinal health. Int Cl A01N 063/04. US5531988. 28 out. 1994; 02 jul. 1996.
46. METCALFE,J.W.; KROGFELT,K.A.; KRIVAN,H.C.; COHEN,P.S.; LAUX,D.C. Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88ab fimbrial adhesin. Infection and Immunity, Washington, v.59, n.1, p.91-96, jan./abr., 1991.
47. MICRO CHEMICAL, Inc., Pratt,W.C., Method and apparatus for administering live bacteria as feed additives to livestock and poultry. Int Cl A23K 001/00. US4910024. 05 jul. 1988; 20 mar. 1990.
48. MINNEY,S. Probiotics - The success story. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Essex, v.51, n.4, p.557-559, abr., 1991.

49. MITSUOKA,T. Intestinal bacteria and health: An introductory narrative. 1ED. Tokyo. Harcourt Brace Jovanovich Japan, Inc., 1978. Cap1, p.1-18.
50. MITSUOKA,T. Microbes in the intestine: Our lifelong partners . 1ED. Tokyo. Yakult Honsha Co. Ltd., 1989. Cap2, p.13-16.
51. NAITO,S.; HAYASHIDANI,H.; KANEKO,K.; OGAWA,M.; BENNO,Y. Development of intestinal lactobacilli in normal piglets. Journal of Applied Bacteriology, London, v.79, n.1, p.230-236, jan., 1995.
52. OLIVA NETO,P. Influência da contaminação por bactérias láticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas, 1990. 190p. Tese (mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
53. O'SULLIVAN,M.G.; THORNTON,G.; O'SULLIVAN,G.C.; COLLINS,J.K. Probiotic Bacteria: mith or reality? Trends in Food Science and Technology, Cambridge, v.3, n.12, p.309-314, dez., 1992.
54. OUWEHAND,A.C.; CONWAY,P.L. Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus. Journal of Applied Bacteriology, London, v.80, n.1, p.311-318, jan., 1996.
55. OVERDAHL,B.J.; ZOTTOLA,E.A. Relationship between bile tolerance and the presence of a rutenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science, Champaign, v.74, n.4, p.1196-1200, abr., 1991.
56. PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.; Rutherford,W.M.; Allen,J.E., Schlameus,H.W., Mangold,D.J., Harlowe Jr.,W.W., Lebeda,J.R., Process for preparing rotary disc fatty acid microspheres of microrganisms. Int Cl C12N 001/00. US5292657. 26 fev. 1992; 08 mar. 1994.
57. SANDERS,M.E. Effect of consuption of lactic cultures on human health. Advances in Food and Nutrition Research, San Diego, v.37, n.1, p.67-130, jan./dez., 1993.

58. SANTOS, M.T. Características da floculação de leveduras causada por *Lactobacillus fermentum*. Campinas, 1991. 93p. Tese (mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
59. SAVAGE,D.C. Bacterial Adhesion: Effects on host animals of bacteria adhering to epithelial surfaces. 1ED. New York: Plenum Press, 1985. cap.15, p.437-463.
60. SCHUT,W. Recent advances on Probiotics. Palestra. V Symposium on Lactic Acid Bacteria, Veldhoven, The Netherlands, 1996.
61. SILVA,N. Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo-de-cana no processo de produção de álcool. Campinas, 1988. 120p. Tese (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
62. STRONG-GUNDERSON,J.M.; PALUMBO,A.V.: Alternative method for rapidly screening microbial isolates for their potential to degrade volatile contaminants. Journal of Industrial Microbiology, Essex, v.13, n.6, p.361-366, nov., 1994.
63. TANNOCK,G.W. The microecology of lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract. Advances in Microbial Ecology, New York, v.11, n.1, p.147-171, jan./dez., 1990.
64. TANNOCK,G.W.; TANGERMAN,A.; SCHAIK,A.V.; McCONNELL,M.A. Deconjugation of bile acids by lactobacilli in the mouse small bowel. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.60, n.9, p.3419-3420, set., 1994.
65. THE UNITED STATES OF AMERICA (SECRETARY OF AGRICULTURE), DeLoach,J.R., Corrier,D.E., Hinton Jr.,A. Probiotic for Control of *Salmonella*. Int Cl C12N 001/20. US5308615. 12 jan. 1992; 03 mai. 1994.
66. THE UNITED STATES OF AMERICA (SECRETARY OF AGRICULTURE), Nisbet,D.J., Corrier,D.E., DeLoach,J.R. Probiotic for Control of *Salmonella*. Int Cl A61K 035/74. US5478557. 13 dez. 1993; 26 dez. 1995.
67. VASAVADA,P.C. Rapid methods and automation in dairy microbiology. Journal of Dairy Science, Champaign, v.76, n.10, p.3101-3113, out., 1993.

68. WALTER,W.A.; BLOCH,K.J. Gastrointestinal transport of macromolecules in the pathogenesis of food allergy. Annals of Allergy, Washington, v.51, n.3, p.240-245, mar., 1983.