

BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PROVENIENTES DE BEZERROS NELORE CRIADOS NO SEMIÁRIDO

[*Lactic acid bacteria with probiotic potential from Nelore calves raised in semiarid*]

Danielle Soares Malveira¹, Fernanda Guimarães², Vanessa de Araujo Veloso³, Eduardo Robson Duarte^{4*}, Igor Viana Brandi⁴, Maxilmiliano Soares Pinto⁴

¹ Docente – Faculdades Integradas do Norte de Minas, Montes Claros, Minas Gerais.

² Pós-graduanda em Produção Animal - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Discente do curso de Engenharia de Alimentos - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴ Docentes – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO – A colibacilose é uma das principais doenças que acomete bezerros nas fases iniciais, provocando prejuízos à bovinocultura. Nesta pesquisa, caracterizou-se e selecionou-se cepas de bactérias lácticas com potencial probiótico, provenientes de bezerros Nelore criados no norte de Minas Gerais. Foram coletadas amostras fecais de bezerros hígidos contemporâneos, com três dias de vida e novamente aos três meses de idade. Após isolamento, realizou-se a quantificação, caracterização morfológica e bioquímica com teste API 50 CH, resistência a pH ácido e a sais biliares e atividade antagonista *in vitro* para três cepas de *Escherichia coli*. Verificou-se população superior ($p < 0,05$) de bactérias lácticas nas fezes dos bezerros na fase colostrar. Quanto à resistência ao ácido clorídrico, 92,3% dos isolados de bezerros recém-nascidos resistiram ao pH 4,0, apresentando-se superior aos isolados de bezerros aos três meses de idade. No teste de antagonismo, os isolados, Be4 1m, Be1 2b e Be6 2a, identificados presuntivamente, como *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus* e *L. pentosus*, respectivamente, produziram média de halo de inibição superior a 10 mm de diâmetro e demonstraram resistência ao pH ácido e sais biliares, indicando potencial para serem utilizados como probióticos.

Palavras-Chave: pecuária de corte; *Lactobacillus* spp.; diarreia neonatal; antagonismo microbiano.

ABSTRACT – Colibacillosis is one of the major diseases of calves, causing huge losses. The aim in this study was to characterize and select lactic bacteria with probiotic potential from Nelore calves raised in northern Minas Gerais. Stool samples from six healthy calves were collected, with three days old and again at three months of age. After isolation, bacteria were enumerated and submitted to morphological and biochemical characterization with API 50 CH test, pH and acid resistance to bile salts and antagonist activity *in vitro* for three strains of *Escherichia coli*. The population of lactic acid bacteria was greater ($p < 0.05$) in feces of the calves at colostrum phase. For resistance to chloric acid, 92.3% of isolates from newborn calves resisted pH 4.0, presenting higher resistance than the isolates from calves at three months of age. In the antagonism test, the isolates Be4 1m, Be1 2b and Be6 2a were presumptively identified as *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus* and *L. pentosus*, respectively, and produced average inhibition zones greater than 10 mm of diameter and showed resistance acid pH and bile salts, indicating potential probiotics.

Keywords: beef cattle; *Lactobacillus* spp.; neonatal diarrhea; microbial antagonism.

* Autor para correspondência. E-mail: duartevet@hotmail.com

Recebido: 14 de fevereiro de 2016.

Aceito para publicação: 04 de julho de 2016.

INTRODUÇÃO

A colibacilose é caracterizada como doença bacteriana infectocontagiosa ocasionada por cepas patogênicas de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Ocorre frequentemente em animais de produção, principalmente os mais jovens, nos primeiros dias de vida, desencadeando diarreia, e a morte, o que promove perdas financeiras consideráveis em sistemas de produção (Duse et al., 2015).

Para o tratamento e controle dessa doença, são frequentemente administrados antibacterianos. No entanto, a toxicidade, alergias e o favorecimento à resistência têm fomentado o interesse clínico e científico por probióticos como alternativa à antibioticoterapia (Bouchard et al., 2015).

Microrganismos probióticos são considerados adjuvantes para melhorar o estado de saúde de bezerros recém-nascido (Magalhães et al., 2008; Bayatkouhsar et al., 2013). Espécies probióticas podem melhorar a resposta imune intestinal, contribuindo com efeitos benéficos na microbiota autoctone intestinal (Luongo et al., 2013). A implementação de probióticos na dieta contribui para melhor crescimento dos bezerros e na diminuição de diarreia (Bayatkouhsar et al., 2013; Soto et al., 2014).

Cepas de bactérias ácido lácticas, utilizadas como probióticos, produzem compostos antimicrobianos como os ácidos orgânicos, ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (Agaliya & Jeevaratnam, 2013; Sharma & Saharan, 2014), além de estimularem a resposta imune inespecífica em hospedeiros, sendo que *Lactobacillus* spp. podem inibir a colonização de diferentes bactérias patogênicas (Rushdy & Gomaa, 2013; Soto et al., 2014).

Poucos estudos têm avaliado e caracterizado a população de bactérias lácticas em bezerros de corte, criados em condições tropicais semiáridas, para selecionar cepas adaptadas e efetivas contra bactérias patogênicas causadoras de diarreia. A utilização dessas cepas poderia prevenir a colibacilose nos bezerros nessas regiões, reduzindo a aplicação de antibacterianos e os prejuízos durante a etapa de cria dos animais. Dessa forma, neste estudo objetivou-se isolar, quantificar e caracterizar bactérias ácido-lácticas com potencial probiótico, provenientes de bezerros de corte, criados no semiárido do norte de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Foram amostrados seis bezerros hígidos e contemporâneos da raça Nelore (*Bos indicus*) nascidos em uma fazenda de Montes Claros, norte de Minas Gerais. Coletou-se aproximadamente 20 gramas de fezes de cada animal em dois períodos. Primeiramente foram amostrados bezerros com três dias de vida, na fase de ingestão de colostro e, posteriormente, com aproximadamente 90 dias de idade, durante a fase de aleitamento. Todos os procedimentos realizados com os bezerros foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, no protocolo n° 219/2011.

Isolamento, seleção e caracterização dos isolados

As amostras foram homogeneizadas e após diluição decimal, 100 µL foram inoculados em placas contendo o meio sólido De Man, Rogosa e Sharpe (MRS). As placas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose com uso de gerador de microaerofilia (Bujnakova; Strakova; Kmet, 2014).

O material foi incubado em estufa BOD a 37°C, durante 48 h. Após esse período, realizou-se a contagem total das unidades formadoras de colônias (UFC), foram selecionadas, no primeiro período das coletas, colônias com morfotipos diferentes para cada animal, totalizando 77 isolados. No segundo período de coleta, foram selecionadas colônias morfológicamente diferentes para cada animal, totalizando 22 isolados.

Em uma triagem inicial, para avaliar a capacidade de coagulação do leite e os isolados que apresentaram crescimento e sobrevivência após as três incubações consecutivas foram selecionados e submetidos aos testes de caracterização bioquímica.

Com a finalidade de testar a habilidade de crescimento das bactérias lácticas em condições aeróbicas, promoveu-se a inoculação em placas contendo meio MRS e incubou-se por 48 horas em estufa BOD à 37 ° C. Após a incubação, foram identificados morfológicamente através do método de Gram 99 isolados, sendo 77 de bezerros recém-nascidos e 22 de bezerros aos 90 dias. Todos os isolados que apresentaram formas de bastonetes Gram positivos não esporulados foram selecionados. O total de 56 isolados de bastonetes Gram positivos, selecionados na etapa anterior, foram submetidos à prova da catalase (Bujnakova; Strakova; Kmet, 2014).

Para avaliar as características probióticas, testou-se a resistência aos sais biliares em diferentes concentrações. Nesta etapa, utilizou-se 27 isolados catalase negativos, sendo 13 do primeiro período de coleta e 14 do segundo período. Esses isolados foram previamente cultivados em caldo MRS a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, foram inoculados 100 µL do inóculo no ágar MRS, contendo 0; 0,3; 0,5 e 1,0 % de sais biliares. Após incubação a 37 °C durante 48 h em jarra de anaerobiose, o crescimento das colônias frente aos sais biliares foi observado visualmente. Os procedimentos foram realizados em duplicata e foram adaptados de Noh & Gilliland (1993).

Posteriormente, avaliou-se a resistência ao ácido clorídrico, o pH do caldo BHI foi ajustado para 3,0, 4,0, 5,0 e 7,0 com adição de ácido clorídrico PA. Os isolados foram inoculados em proporção de 5% para cada meio contendo o pH avaliado e incubados a 37 °C. O crescimento foi avaliado após seis horas e em seguida foram inoculados 50 µL desse meio acidificado em placas contendo ágar MRS. Os materiais foram cultivados em anaerobiose a 37 °C e após 48 h observou-se visualmente o crescimento comparando com o controle em pH 7. Foi definido o padrão ++++ (100%) representando o crescimento das colônias no controle com pH 7, e +++, ++ e +, respectivamente para 75%, 50%, 25% do crescimento desse controle e negativo para a ausência de crescimento.

Para caracterização bioquímica de 26 isolados selecionados, sendo 13 de bezerros recém-nascidos e 13 dos bezerros aos três meses de idade, promoveu-se a caracterização utilizando o teste de fermentação de 49 substratos API 50 CHL, BioMérieux SA, Marcy- l'Etoile/ França). As leituras foram efetuadas em 24 e 48 h após inoculação nas galerias do teste. Para análise dos resultados, utilizou-se o programa de probabilidade LAB PLUS *software version* 4.0 database da BioMerieux, Marcy l'Etoile, France.

Efeito antagonista dos isolados de *Lactobacillus* spp. selecionados

O efeito antagonista dos 26 isolados selecionados foi avaliado para três isolados de *Escherichia coli* como bactérias reveladoras, sendo um deles a cepa ATCC 25922 (E1). O segundo isolado foi proveniente de fezes de uma bezerra com um mês de idade (E2) e o terceiro proveniente do intestino delgado de um bezerro macho com dois meses de idade (E3), sendo que ambos apresentavam diarreia. Os isolados dos bezerros foram obtidos em cultivos contendo o meio sólido Mac Conkey e identificados presuntivamente, utilizando-se o meio Rugai Modificado e em provas bioquímicas no Departamento de Microbiologia do Instituto de

Ciências Biológicas da UFMG.

A inibição do crescimento dessas bactérias patogênicas foi verificada com adaptação do método descrito por Tagg & Mc Given (1971). As culturas puras de cada isolado de *E. coli*, em fase de exponencial, foram inoculadas em toda a superfície de uma placa contendo ágar Mueller Hinton. Em seguida, discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, impregnados com o caldo MRS contendo um dos 26 isolados de bactérias lácticas cultivadas a 37 °C durante 48 h, foram aplicados sobre a superfície do ágar para verificar formação de halos de inibição após o período de incubação de 48 h (Chaves et al., 1999). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Com a finalidade de confirmar o efeito antagonista, realizou-se a técnica de difusão em sobrecamada de ágar, utilizando as bactérias reveladoras E1, E2 e E3. Os isolados de *Lactobacillus* spp. que apresentaram resultado positivo no teste de antagonismo anterior, foram inoculados na superfície do ágar MRS, proporcionando o crescimento da colônia no formato circular com diâmetro médio de 0,4 mm. As placas foram incubadas por 48 horas em anaerobiose a 37°C. Após o período de crescimento os isolados de *Lactobacillus* spp. foram expostos ao vapor de clorofórmio (1 mL em papel filtro), por 30 minutos, para promover a morte das células. Após esse período, as placas foram abertas, por 40 minutos, para evaporação do clorofórmio residual. Em seguida, uma sobrecamada de 20 mL de meio contendo Ágar Nutriente, a aproximadamente 40° C e previamente inoculado com as amostras reveladoras E1, E2 ou E3, foi vertido sobre as placas e incubadas por 24 horas em anaerobiose a 37° C. O halo de inibição formado ao redor da colônia de *Lactobacillus* spp. foi mensurado conforme Sarkar & Banerjee (1996). Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas.

Análise dos dados

Após a análise exploratória, os dados obtidos da quantificação das colônias foram transformados para $\log_{10}(X+10)$ e as médias de contagens bacterianas foram comparadas pelo teste t de Student. Os valores da frequência de coagulação do leite foram comparados utilizando-se o teste Qui-quadrado. Para o teste de antagonismo, as médias dos halos de inibição foram comparadas com o teste de Kruskal-Wallis. Utilizou-se o pacote SAEG, versão 9,1 (2007), considerando o nível de significância de 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, seleção e caracterização dos isolados

Verificou-se positividade de bactérias crescidas no meio MRS para todos os bezerros avaliados e em ambos os períodos estudados e constatou-se concentração significativamente superior dessas bactérias nas fezes dos bezerros na fase colostrar (Tabela 1). Aos três meses de idade, os bezerros já consumiam outros alimentos como pontas de capim e sal mineral, o que favoreceria outros microrganismos que poderiam competir com as bactérias lácticas. Por outro lado, como a quantidade de lactose estaria menor na dieta total disponível aos bezerros aos três meses, poderia ocorrer

redução do crescimento das bactérias lácticas, que utilizam preferencialmente essa fonte de carboidrato.

Em outro estudo com bezerros da raça Holandesa, verificou-se que a contagem de bactérias ácido lácticas não diferiu entre os 14 e 28 dias após o nascimento dos bezerros. Entretanto o grupo suplementado com probiótico apresentou média superior de população de *Lactobacillus* spp. quando comparado ao grupo não suplementado (Bayatkouhsar et al., 2013).

Tabela 1. Quantificação de bactérias em meio MRS provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos e aos 90 dias, criados no norte de Minas Gerais, Brasil.

| Animais com três dias de idade | | Animais com 90 dias de idade | |
|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Bezerros | Média UFC* g ⁻¹ de fezes | Bezerros | Média UFC* g ⁻¹ de fezes |
| Be1 | 1.75 x 10 ⁹ | Be1 | 5.70 x 10 ⁶ |
| Be2 | 2.97 x 10 ⁹ | Be2 | 2.0 x 10 ⁶ |
| Be3 | 77.00 x 10 ⁹ | Be3 | 2.90 x 10 ⁶ |
| Be4 | 65.00 x 10 ⁹ | Be4 | 9.90 x 10 ⁶ |
| Be5 | 2.82 x 10 ⁹ | Be5 | 6.70 x 10 ⁶ |
| Be6 | 2.64 x 10 ⁹ | Be6 | 4.80 x 10 ⁶ |
| Média | 25.36 x 10 ⁹ a | Média | 5.33 x 10 ⁶ b |

* Unidades formadoras de colônia. Nota: Médias com letras diferentes na linha indicam diferença significativa com p < 0,001 (teste de Student).

O total de 99 isolados (77 da fase colostrar e 22 dos bezerros aos 3 meses de idade) foi avaliado quanto à capacidade de coagulação do leite. Observou-se que 80,5% e 95,5% de isolados provenientes de bezerros recém-nascidos e aos 90 dias,

respectivamente, foram positivos para essa habilidade (Tabela 2). Algumas bactérias lácticas oxidam a lactose do leite até ácido láctico, reduzindo o pH e promovendo a coagulação do leite (Bujnakova; Strakova; Kmet, 2014).

Tabela 2. Quantificação e seleção quanto ao morfotipo, capacidade de coagulação do leite, síntese de catalase e micromorfologia de isolados de bactérias crescidas em meio MRS provenientes de fezes de bezerros Nelore recém-nascidos e aos 90 dias, criados no norte de Minas Gerais, Brasil.

| Idade dos Animais | Número de morfotipos das colônias | Coagulação do leite** | Bastonetes Gram Positivos** | Catalase Negativa** |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| Recém-nascidos | 77* | 62 (80,5%) | 35 (56,4%) | 14 (40,0%) |
| Aos 90 dias | 22 | 21 (95,5%)* | 21 (100,0%)* | 20 (95,2%)* |
| Total | 99 | 83 (83,8%) | 56 (67,5%) | 34 (60,7%) |

* indica diferença significativa no teste qui-quadrado com valores de p < 0,05.

** Isolados com resultados não compatíveis com *Lactobacillus* spp. foram eliminados nos testes subsequentes.

Do total de 62 isolados provenientes dos bezerros recém-nascidos que coagularam o leite, 56,4% (35 isolados) eram bastonetes Gram positivos (Tabela 2). Já na análise micromorfológica dos isolados provenientes dos bezerros aos três meses de idade, 95,5% eram bastonetes Gram positivos (21 isolados). Para os 56 isolados bastonetes Gram positivos, que foram submetidos ao teste de catalase, 34 foram negativos para a produção dessa enzima (Tabela 2). Observou-se que para os bezerros recém-nascidos, a população de bactérias era constituída por maior diversidade de morfotipos, com características distintas do gênero *Lactobacillus* e por isso, proporcionalmente menos isolados foram selecionados (Tabela 2). Por outro lado, para os bezerros aos 90 dias de vida,

verificou-se o predomínio de bactérias catalase negativo, bastonetes Gram positivos e com habilidade de coagulação do leite, características compatíveis com o gênero selecionado (P < 0,05) (Tabela 2). Essas diferenças observadas poderiam ser atribuídas ao processo de colonização e estabilização da microbiota autóctone dos bezerros, que é influenciado diretamente pela idade e dieta dos animais (Duse et al., 2015).

Para os bezerros recém-nascidos, verificou-se que 100% dos 14 isolados de *Lactobacillus* spp. selecionados resistiram à concentração de 0,3 e 0,5% de sais biliares. Na concentração máxima de 1 % de sal biliar, 92,3 % dos isolados resistiram e apresentaram crescimento. Já para os isolados dos

bezerros aos três meses de idade, 100, 92,3 e 84,6% resistiram à concentração de 0,3, 0,5 e 1%, respectivamente.

Em estudo realizado por Chaves et al. (1999), com bactérias isoladas de bezerros, observou-se que todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* cresceram bem nas diferentes concentrações de sais biliares. Resultados similares foram observados com *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* no mesmo estudo. Esse resultado corrobora o evidenciado nesta pesquisa, uma vez que os isolados Be1 2b (*L. fermentum*), Be5 2b (*L. plantarum*), Be2 ij, Be2 1h, Be3 1i, Be4 1c2, Be6 1n e Be4 2b (*L. brevis*), cresceram bem nas concentrações de sais biliares de 0,3, 0,5 e 1 %, excetuando o crescimento do isolado Be5 2b na concentração de 1%.

A bile é um componente antimicrobiano importante para o sistema digestório e é formada por diferentes substâncias. Os sais biliares são capazes de promover danos à membrana celular e na estrutura do DNA bacteriano (Merritt & Donaldson, 2009). Portanto, a tolerância a esses compostos é fundamental para sobrevivência do microrganismo probiótico no trato gastrointestinal. Um fator que pode favorecer a sobrevivência dos microrganismos no duodeno é a presença de alimentos. As bactérias podem não ficar expostas aos sais de bile, uma vez que o alimento pode interagir com os ácidos biliares, evitando, dessa forma a toxicidade sobre as membranas microbianas (Merritt & Donaldson, 2009).

Do total de 13 isolados de bezerros recém-nascidos, 46,2% e 92,3% apresentaram bom crescimento (+++ ou ++++), respectivamente, para o meio ajustado com o pH 3 e 4. Para o meio ajustado com pH 5 e 7, todos os isolados apresentaram bom crescimento (+++ ou +++). Já para os 13 isolados provenientes dos bezerros aos 90 dias de idade, 61,5% e 76,9% apresentaram bom crescimento (+++ ou ++) para o pH 3 e 4, respectivamente, o que revela alta proporção de colônias com resistência às maiores concentração de ácido clorídrico.

Estudos realizados por Vieira et al. (2013) indicaram a resistência em pH 6 para bactérias láticas com potencial probiótico. Todas as espécies apresentaram perdas no crescimento, porém, as estirpes *L. plantarum* 1, 2 e 3; *L. brevis* 1 apresentaram menores perdas de crescimento. Após a ingestão dos alimentos, o estômago se esvazia com aproximadamente duas a quatro horas. As bactérias que sobrevivem às condições fisiológicas desse órgão, posteriormente, deverão resistir às

secreções de sais biliares no duodeno (Pennacchia et al., 2004).

Uma pesquisa avaliou 73 isolados de *Lactobacillus* spp. provenientes de aves e bezerros em testes de tolerância ao pH 2,5 e ao 0,5% de oxbili. Foram selecionados somente 27,4 % desses isolados, identificados como *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus amylovorus* (Bujnakova; Strakova; Kmet, 2014).

A capacidade de crescimento em aerobiose foi constatada para 69,2% dos isolados provenientes das fezes dos bezerros e em proporções iguais para ambas às idades avaliadas (Tabela 2). O crescimento de alguns microrganismos como os do gênero *Lactobacillus*, em condições de aerobiose promove a formação de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que constituem os principais fatores responsáveis pela toxicidade do oxigênio. Bactérias láticas provenientes dos bezerros de corte no primeiro período de vida não fermentaram glicerol, eritrol, D- arabinose, L- xilose, D- xdonitol, metil- βD- xilopiranosido, L- sorbose, inositol, metil-αD-manopiranosido, dulcitol, D-melezitose, glicogênio, xilitol, D- lioxose, D- fucose e 5- cetogluconato de potássio. Já os isolados provenientes dos bezerros aos 90 dias de vida não fermentaram eritrol, D- arabinose, L- xilose, D-adonitol, metil-βD-xilopiranosido, L- sorbose, dulcitol, inositol, D-lixose, D-fucose, L- fucose, D-arabitol, L- Arabitol, 2-cetogluconato de potássio e 5-cetogluconato de potássio, D- melezitose e xilitol.

A distribuição das espécies de *Lactobacillus* spp. variou para as duas idades avaliadas (Figura 1). A análise bioquímica indicou o predomínio das espécies *Lactobacillus lactis* ssp. e *L. brevis* para os bezerros recém-nascidos, correspondendo a 53,8 e 38,5% dos isolados identificados. O isolado Be4 1m correspondeu à espécie *Lactobacillus salivarius* com 99,9 % de similaridade. Já para as bactérias láticas provenientes dos bezerros aos três meses de idade, verificou-se o predomínio da espécie *Lactobacillus pentosus*, que correspondeu a 46,1% dos isolados. O isolado Be1 2b foi identificado como *Lactobacillus crispatus* com similaridade de 99,9% e o Be6 2a correspondeu a *Lactobacillus pentosus* com 89,3% de similaridade.

Em outro estudo sobre a caracterização de isolados provenientes de fezes de bezerros, Chaves et al. (1999), identificou 12 (2,28%) cepas de *Lactobacillus acidophilus*, a partir de fezes de bezerros com 1 a 3 dias de idade utilizando a mesma metodologia empregada neste presente estudo.

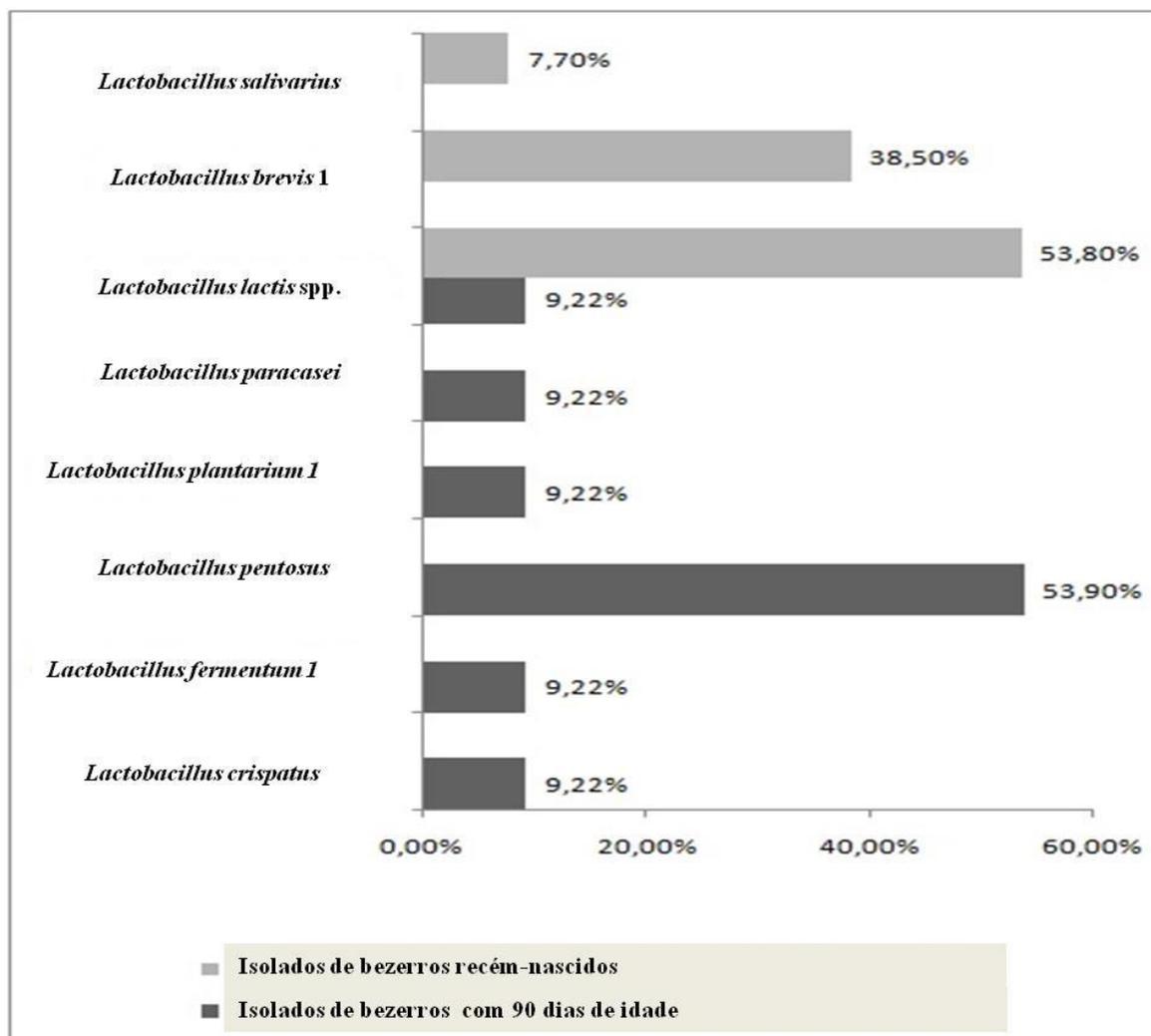


Figura 1. Identificação presuntiva de bactérias lácticas provenientes de fezes de bezerros Nelore criados no norte de Minas Gerais, Brasil.

Efeito antagonista dos isolados de *Lactobacillus* spp. Selecionados

No teste de antagonismo, verificou-se que os isolados Be4 1m (*L. salivarius*), Be1 2b (*L. crispatus*) e Be6 2a (*L. pentosus*) apresentaram atividade contra as bactérias reveladoras E3, E2 e E2, respectivamente (Tabela 3). O isolado Be4 1m

apresentou inibição muito forte, com halo de 20 mm frente à *E. coli* proveniente do intestino delgado de um bezerro macho com dois meses de idade (E3). Em metodologia similar, Chaves et al. (1999) constatou que quatro isolados apresentaram antagonismo considerado forte frente à cepa de *Escherichia coli* enteropatogênica.

Tabela 3. Valores médios do halo de inibição em milímetros do antagonismo de *Lactobacillus* spp. provenientes de fezes de bezerros Nelore, criados no norte de Minas Gerais, Brasil para três cepas de *Escherichia coli*.

| Isolados | Espécie | E1 | E2 | E3 |
|----------|---------------------------------|------|------|------|
| Be1, 2b | <i>Lactobacillus crispatus</i> | 12,3 | 9,3 | 13,7 |
| Be4, 1m | <i>Lactobacillus salivarius</i> | 15,0 | 12,3 | 13,3 |
| Be6, 2a | <i>Lactobacillus pentosus</i> | 12,3 | 10,7 | 20,0 |

Nota: E1 (ATCC 25922); E2 (proveniente de fezes de uma bezerra com um mês de idade com diarreia); E3 (proveniente do intestino delgado de um bezerro macho com dois meses de idade com diarreia).

Em estudos realizados por Maldonado et al. (2012), a partir de fezes de bezerros, os isolados de bactérias ácido lácticas apresentaram atividade inibitória sobre *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. dublin* e *Klebsiella* spp., principalmente pela produção de

ácido láctico, mostrando os bacilos com o mais alto grau de inibição.

O *Lactobacillus crispatus* (Be1, 2b) e o *Lactobacillus pentosus* (Be6, 2a), foram mais

eficientes na inibição da E3, tendo como média dos halos 13,7 mm e 20 mm respectivamente. Esses mesmos *Lactobacillus* apresentaram valores iguais de halo médio de inibição para a E1, evidenciando assim a mesma eficiência contra essa reveladora. O *Lactobacillus salivarius* (Be4, 1m), apresentou maior antagonismo frente à E1, com o halo médio de inibição de 15 mm. De acordo com o parâmetro estabelecido por Sarkar & Banerjee (1996), os resultados foram positivos, uma vez que as médias foram representativamente maiores que 3 mm.

Em estudo realizado com vitelos administrou-se duas preparações diferentes contendo seis espécies de *Lactobacillus* spp. provindos de bovinos e humanos. Observou-se redução na mortalidade, na incidência de diarreia e na redução da contagem de coliformes fecais quando se utilizou cepas bovinas (Timmerman et al., 2005).

A utilização de *Lactobacillus* spp. pode ainda contribuir com a redução da excreção ambiental de bactérias patogênicas (Pond et al., 2014). A alimentação de bovinos jovens com flocos de milho adicionado de *Lactobacillus acidophilus* durante as últimas semanas do abate, mostrou-se efetivo na redução de 57% de *E. coli* O157 na excreção fecal (Younts-Dahl et al., 2004). Em outra pesquisa, a alimentação diária com *L. acidophilus* em bezerros durante o período de dois anos promoveu redução de 35% de *E. coli* O157:H7 na excreção fecal (Peterson et al., 2007).

O antagonismo de *Lactobacillus* spp. em cepas de bactérias patogênicas tem sido atribuído a ação de bacteriocinas. Um estudo verificou a presença de *L. casei* (27%), *L. delbrukii* (43%) e *L. fermentum* (30%) no colostro de búfalas. As bacteriocinas produzidas por essas bactérias inibiram bactérias como *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* iniciando amplo espectro de ação (Viswanathan et al., 2015).

Além da variação entre as espécies de bactérias lácticas a produção de bacteriocinas pode ser influenciada pela composição e pH do meio e até mesmo a fase de crescimento do microrganismo produtor (Schillinger, 2014). A eficácia das bacteriocinas é muitas vezes ditada por fatores ambientais, como, além do pH, a temperatura, a composição, estrutura e microbiota presente nos substratos (Agaliya & Jeevaratnam, 2013). Dessa forma, esses fatores devem ser considerados em futuros estudos para maximização do efeito antagonista verificado para os isolados selecionados nesta presente pesquisa.

CONCLUSÕES

Isolados com características de *Lactobacillus* spp. provenientes de bezerros de corte apresentam resistência a pH ácido e a sais biliares. As espécies *L. lactis* ssp. e *L. brevis* predominam entre os isolados provenientes dos bezerros recém-nascidos, enquanto *L. pentosus* corresponde à espécie mais frequente para os isolados provenientes dos bezerros aos três meses de idade. Três isolados de *Lactobacillus* spp. selecionados apresentaram forte antagonismo contra cepas de *Escherichia coli* provenientes de bezerros com diarreia, indicando potencial probiótico.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq- UFMG), da Pró-reitoria de Graduação (PROGRAD) pelo Programa Especial de Bolsas Acadêmicas para Estudantes dos Cursos Noturnos de Graduação da UFMG (PRONOTURNO).

REFERÊNCIAS

- Agaliya, P. J.; Jeevaratnam, K. Characterisation of the bacteriocins produced by two probiotic *Lactobacillus* isolates from idli batter. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1525-1535, 2013.
- Bayatkouhsar, J. et al. Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 186, p. 1-11, 2013.
- Bouchard, D. S. et al. Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. **PLoS one**, v. 10, p. 1-18, 2015.
- Chaves, A. H. et al. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p. 1086-92, 1999.
- DUSE, A. et al. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. **J. Dairy Science**, v. 98, p. 500-516, 2015.
- Bujnakova, D; Eva Strakova, E; Kmet, V. *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. **Anaerobe**, v. 29, p. 118-127, 2014.
- Luongo, D. et al. Differential modulation of innate immunity in vitro by probiotic strains of *Lactobacillus gasseri*. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 1-12, 2013.
- Magalhães, V. J. A et al. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 91, 1497-1509, 2008.

Maldonado, N. C. et al. Lactic acid bacteria isolated from young calves – Characterization and potential as probiotics. **Research in Veterinary Science**, v. 92, 342-349, 2012.

Merritt, M. E.; Donaldson, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1533-1541, 2009.

Noh, D. O.; Gilliland, S.E. Influence of bile on cellular integrity and b-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1253-1259, 1993.

PENNACCHIA, C. et al. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

Peterson, R. E. et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *E. coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 287-291, 2007.

Pond, A. et al. Reduction of *Escherichia coli* O157 and non-O157 O groups in the feces of commercial feedlot cattle using a high-dose of NP51, a *Lactobacillus*-based pre-harvest intervention. **Meat Science**, v. 96, p. 487-488, 2014.

Rushdy, A. A.; Gomaa, E. Z. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 81-90, 2013.

Sarkar, P. K.; Banerjee, S. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. **Journal Food Science Technology**, v. 33, p. 231-233, 1996.

Sharma, D.; Saharan, B. S. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal Of Microbiology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

Schillinger, U. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. In: Biotechnology and Food Safety: Proceedings of the Second International Symposium. Elsevier, p. 55, 2014.

Soto, L.P. et al. Effects of bacterial inoculants in milk on the performance of intensively reared calves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 189, p.117-122, 2014.

Tagg, J.R.; MC. Given, A. R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v. 21, p. 943, 1971.

Timmerman, H. M. et al. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2154-2165, 2005.

Vieira, F. N. et al. A. *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 998-1004, 2013.

Viswanathan, G. et al. Probiotic studies in colostrum of buffalo. **Global Veterinaria**, v. 14, n .2, p. 199-204, 2015.

Younts-Dahl, S. M. et al. Reduction of *E. coli* o157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 6-10, 2005.