SELEÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* PARA PROBIÓTICO EM BEZERROS¹

ANTONIO HAMILTON CHAVES², JOSÉ FERNANDO COELHO DA SILVA³, ADÃO JOSÉ REZENDE PINHEIRO⁴,
SEBASTIÃO DE CAMPOS VALADARES FILHO³, ORIEL FAJARDO DE CAMPOS⁵

¹ UFV/ CNPGL, parcialmente financiado pela FAPEMIG, ²Zootecnista, MS, Doutorando do DZO, UFV, Viçosa MG, ³ Docentes do DZO, UFV, Viçosa - MG, Bolsistas do CNPq, ⁴ Docente do DTA, UFV, Viçosa - MG, ⁵ Pesquisador EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco - MG, Bolsista do CNPq

RESUMO: Doze isolados de *Lactobacillus acidophilus*, foram submetidos aos testes de seleção, tais com omo resistência a líquido ruminal, ácido clorídrico, lisozima, fenol, sais biliares e antibióticos, e antagonismo a uma estirpe de *E. coli* enteropatogênica. O LT 516, apresentou melhor desempenho para ser usado como probiótico, apesar de não coagular o leite com 18 horas de incubação e ser classificado como lento. No líquido ruminal e nos testes de resistência ao ácido clorídrico, à lisozima, ao fenol, aos sais biliares e aos antibióticos, este isolado comportou-se de acordo com a média dos outros isolados. No teste de antagonismo à *E. coli*, os os isolados LT 516 e LT 158A foram muito eficientes, entretanto o isolado LT 516 apresentou maior resistência à lisozima e ao ácido clorídrico (pH 3,0). O isolado LT 158A também classificado como cultura lenta na produção de ácido láctico, teve resultados bastante similares ao LT 516 frente ao líquido ruminal. Qualquer dos dois isolados, ou ambos simultaneamente, podem ser usados.

PALAVRAS-CHAVES: Bactéria, diarreia, pré-ruminante, probiótico

SELECTION OF *Lactobacillus acidophilus* AS PROBIOTICS FOR CALVES

ABSTRACT: Twelve *Lactobacillus acidophilus* isolates were submitted to several screening tests including acidifying capacity, resistance to some substances such as ruminal liquid, hydrochloric acid, lysozyme, phenol, biliary salts and several antibiotics and antagonism toward *E. coli*, an intestinal pathogenic strain. The isolate LT 516 showed the best performance, although it did not coagulate milk after 18 hours of incubation. In the assays with ruminal liquid, hydrochloric acid, lysozyme, phenol, biliary salt and several antibiotics it was similar to the other isolates, but in the antagonism test to *E. coli* the LT 516 and LT 158A isolates were very efficient. Each one of these isolates or both simultaneously can be used as probiotics for calves.

KEYWORDS: Bacteria, diarrhea, preruminant, probiotic

INTRODUÇÃO

Bactérias usadas como probiótico para atuarem no intestino delgado, devem apresentar certas qualidades básicas. Pela importância da seleção "in vitro" dos isolados, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar as resistências de 12 isolados de *Lactobacillus acidophilus* à lisozima, ácido clorídrico, fenol, sais biliares e ao líquido ruminal; b) determinar a produção de ácido láctico e concentração hidrogeniônica; c) testar as resistências destes isolados frente à diversos antibióticos e d) avaliar suas capacidades antagonicas frente à uma estirpe de *E. coli* enteropatogênica.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliou-se a capacidade acidificante dos 12 isolados, inoculando 1% da cultura em leite

desnatado reconstituído (LDR) e determinando a acidez (°Dormic) e o pH nos tempos 0; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27; 30; 36 e 48 horas de incubação a 37°C. Os isolados foram também avaliados quanto à resistência ao líquido ruminal e diversas substâncias, tais como ácido clorídrico (DE MAN et al., 1960), à lisozima (AGOSTINHO, 1988), fenol (DAVIS, 1955), à sais biliares (GILLILAND et al., 1985; FLOCH et al., 1970; NOH e GILLILAND, 1993) e a diferentes antibióticos (WISTREICH e LECHTMAN, 1976; NCCLS, 1983). Os isolados foram testados, quanto às suas capacidades antagonicas à uma estirpe de *E. coli* enteropatogênica isolada de fezes de bezerro com diarreia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de ácido láctico produzido pelos diferentes isolados variou de 1,48 a 1,71% com 48 horas de incubação; sendo que com 21 horas esta variação foi de 0,73 a 0,83%. O pH variou de 3,72 a 3,54 para 48 horas e de 5,26 a 4,77 para 21 horas de incubação. O líquido ruminal não é um bom meio, pelo menos "in vitro", para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, mas por outro lado não causa efeitos deletérios graves sobre este microrganismo. A taxa de crescimento no líquido ruminal natural após 12 horas de incubação foi de 17,77% e quando o líquido ruminal foi esterilizado 83,33%. Após 24 horas de incubação a taxa de sobrevivência no líquido ruminal natural foi de 56,21% e no esteril 56,79%. A média de sobrevivência em meio com ácido clorídrico após uma hora de exposição a pH 2,0 foi de apenas 0,53%, enquanto em pH 3,0 obtiveram-se 55,61, 26,14 e 11,70% com 1, 2 e 3 horas de exposição ao ácido clorídrico, respectivamente. Com 11,70% de sobrevivência, o número de unidade formadoras de colônias (UFC) foi de $6,67 \times 10^7$ /mL. Quando expostas a lisozima do ovo, todos os isolados apresentaram taxas de lises bem inferiores ao *Micrococcus lysodeikticus* (microrganismo usado como controle de lise), que apresentou uma taxa de lise de 0,63% de transmitância/min. para a lisozima do ovo e 1,82% para a lisozima do leite bovino. Os isolados cresceram bem no meio com até 0,3% de fenol, mesmo com 0,4 e 0,5%, alguns isolados ainda apresentaram algum crescimento. Os isolados apresentaram diferentes resistências aos sais biliares, os que não alcançaram 0,3 de absorvância com 0,3% de "oxgall" com 8 horas de incubação, ficaram muito próximos disto. Houve diferença de sensibilidade dos isolados frente aos diversos antibióticos (Quadro 1) e os resultados do Quadro 2, indicam que, 4 isolados apresentaram antagonismo considerado forte frente à *E. coli* enteropatogênica.

CONCLUSÃO

O LT 516, apresentou melhor desempenho para ser usado como probiótico; o LT 158A também teve resultados bastante similares

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINHO, S. M. M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H₂B₂₀ sob condições do trato digestivo "in vitro" e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** Viçosa - M.G., Universidade Federal de Viçosa, 1988. 70p. (Tese M.S.).
2. DAVIS, G. H. The classification of lactobacilli from the human mouth. **Journal of General Microbiology**, v.13, p. 481 - 493, 1955.
3. DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, P. 130 - 135, 1960.
4. FLOCH, M. H., GERSHENGOREN, W., DIAMOND, S. et al. Cholic acid inhibition of intestinal bacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 23, p. 8 - 10, 1970.
5. GILLILAND, S. E., NELSON, C. R., MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 377 - 381, 1985.
6. NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, "Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests". M2 T3, vol. 3 nº 14, 1983.
7. NOH, D. O., GILLILAND, S. E. Influence of bile on celular integrity and β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**,v. 76, p. 1253 -1259, 1993.
8. WISTREICH, G.A. & LECHTMAN, M.D. **Microbiology and human disease.** Second edition. Glence publishing Co., INC. California. Collier Macnillan Canada, Ltd. 1976. 905p.

Antibióticos	Isolados											
	LT154A	LT 156B	LT 158A	LT 350	LT 360	LT 361	LT 482	LT 484	LT 510	LT 516	LT 518	LT 520
Sulfazotrim	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	R	R	R	I	S	I	R	S	R	S	I	S
Kanamicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amicacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol	I	I	R	I	I	I	I	R	I	I	S	S
Carbenicilina	I	R	R	I	S	S	I	R	R	I	I	S
Ampicilina	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S
Cefoxitina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina	R	R	R	I	S	I	R	R	R	S	S	S
Cefazolina	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	R
Cefotaxina	R	R	R	I	I	I	I	R	I	I	S	I

R → Resistente.

I → Intermediário.

S → Sensível.

Quadro 2 - Atividade antagonista dos isolados frente a uma estirpe de *E. coli* (K99) enteropatogênica

Isolados	Diâmetro (mm) dos halos de inibição	Inibição
LT154A	13	Moderada
LT156B	16	Forte
LT158A	18	Forte
LT 350	12	Moderada
LT 360	12	Moderada
LT 361	12	Moderada
LT 482	11	Moderada
LT 484	11	Moderada
LT 510	13	Moderada
LT 516	18	Forte
LT 518	14	Moderada
LT 520	16	Forte