

ISOLAMENTO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EM FEZES DE 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: O experimento objetivou isolar, caracterizar e identificar *Lactobacillus acidophilus*, à partir de fezes de bezerros. Foram realizados os seguintes testes para caracterização dos isolados: morfologia celular, teste de gram, catalase, produção de gás à partir da glicose, crescimento à 15 e 45°C; redução do "Litmus Milk", crescimento no meio com cloreto de sódio, hidrólise da arginina, redução do nitrato e fermentação de diferentes "carboidratos". De um total de 526 "isolados" iniciais, obtiveram-se 12 (2,28%) estirpes de *Lactobacillus acidophilus*.

PALAVRAS-CHAVES: Bactéria, bezerro, diarreia, probiótico

ISOLATION OF *Lactobacillus acidophilus* FROM FECES OF CALVES

ABSTRACT: *Lactobacillus acidophilus* was isolated and characterized from feces of calves. The tests used to characterize the isolates were : cellular morphology, gram, catalase, gas production, growth at 15 and 45 °C, Litmus Milk reduction, growth on culture medium with sodium chloride, arginine hydrolisis, nitrate reduction and carbohydrate fermentation. From a total of 526 isolates, 12 (2.28%) strains of *Lactobacillus acidophilus* were identified to be able to resist the intestinal tract conditions of calves.

KEYWORDS: Bacteria, calves, diarrhea, probiotic

INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos são usados como probióticos. Dentre os lactobacilos, um dos mais indicados para preparo de probióticos é o *Lactobacillus acidophilus* que produz, além de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, as bacteriocinas que inibem o crescimento de várias bactérias, incluindo a *E. coli* e *Salmonella* sp., principais causadoras de desordens gastrointestinais em bezerros. O presente trabalho, objetivou isolar, caracterizar e identificar estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, com características próprias ao uso como probiótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de fezes de bezerros com 1 a 3 dias de idade, foram preparadas e diluídas em solução tampão fosfato, (pH 7,2). As colônias obtidas em meio agar seletivo para lactobacilos (Rogosa SL) (KANDLER e WEISS, 1986) foram transferidas para tubos contendo o meio de cultura MRS (DE MAN et al., 1960), com 0,15% de sais biliares e incubadas a 37°C (GILLILAND e SPECK, 1977). As culturas com crescimento foram reisoladas sendo várias colônias transferidas para tubos contendo leite desnatado reconstituído (LDR) com 12% de extrato seco desengordurado (ESD) esterilizado e incubadas a 37°C até coagulação. As culturas que coagularam o LDR foram submetidas ao teste de gram e análises morfológicas (PELCZAR et al., 1981), catalase (SPECK, 1984);

produção de gás à partir da glicose (COLLINS e HARTLEIN, 1982); capacidade de crescimento a diferentes temperaturas (KANDLER e WEISS, 1986); redução do "Litmus Milk" (SKERMAN, 1959); crescimento em diferentes teores de cloreto de sódio (DAVIS, 1955); hidrólise da arginina (COWAN e STEEL, 1965; BIER, 1985); redução do nitrato (NORRIS e RIBBONS, 1971); fermentação de diferentes substratos (KANDLER e WEISS, 1986). Os isolados, até então com características próprias do *Lactobacillus acidophilus* foram submetidos ao "Rapid CH strips" (teste API).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras plaqueadas no meio agar rogosa SL e incubadas sob baixo teor de oxigênio a 37°C por 48hs, a contagem teve como média 4,7 X 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por gramas de fezes. Após as etapas de crescimento em MRS enriquecido com 0,15% de sais biliares, crescimento e coagulação do leite, obtiveram-se 526 isolados, com uma média de 32,88 isolados por bezerro. Quando submetidos ao teste de gram, 154 (29,3%) apresentaram-se como bastonetes gram-positivos, porém ocorreram variações na morfologia destes isolados, consideradas normais (KANDLER e WEISS, 1986). Destes 152 (98,7%) mostraram negativos ao teste da catalase, que caracteriza bactérias lácticas (*Lactobacillus*

acidophilus) (ROGOSA, 1974). Estes foram submetidos ao teste de produção de gás à partir da glicose, sendo que 7 (4,6%) produziram gás. Os 145 isolados, até então gram-positivos, catalase-negativos e não produtores de gás à partir da glicose, foram submetidos aos testes de caracterização. Destes, 18 (12,4%) cresceram e coagularam o leite a 15°C por 30 dias e 31 (21,4%) não cresceram a 45°C por 72 hs. Consequentemente 100 (69%) isolados não cresceram a 15°C por 30 dias e cresceram a 45°C por 72 hs. No teste de redução do "Litmus milk", 5 (3,4%) não reduziram o meio, no entanto, o *Lactobacillus acidophilus* reduz o "Litmus milk"; 102 (70,3%) cresceram e 96 (66,2%) não cresceram, respectivamente, nas concentrações de 4 e 8% de NaCl. Todos os isolados testados (145), apresentaram resultados negativos à hidrólise de arginina, e teste de redução de nitrato. Portanto, 68 (46,9%) não cresceram a 15°C; cresceram a 45°C; reduziram o "Litmus milk"; não cresceram em presença de 8% de cloreto de sódio; não produziram amônia à partir da arginina e não reduziram o nitrato.

Dos 68 isolados, 23 (33,8%) (Quadro 1) apresentaram características próprias do *Lactobacillus acidophilus* em relação à fermentação de carboidratos (KANDLER e WEISS, 1986); os quais foram posteriormente submetidos ao teste API. Destes 23 isolados submetidos ao teste API, 12 (52,2%) mantiveram os resultados compatíveis com as características do *Lactobacillus acidophilus* (Quadro 1).

CONCLUSÃO

De um total de 526 isolados iniciais, obtiveram-se 12 (2,28%) estirpes de *Lactobacillus acidophilus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O. Lactobacilos. In: **Microbiologia e imunologia**. 24º ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1985. 1234p.
2. COLLINS, E. B. & HARTLEIN, K Influences of temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks. **J. Dairy Sci.** v. 65, p. 883 - 886, 1982.
3. COWAN, S. T. & STEELL, J. K. **Manual for the identification of medical bacteria**. Cambridge University Press, 1965. 217p.
4. DAVIS, G. H. The classification of lactobacilli from the human mouth. **Journal of General Microbiology**, V.13, p. 481 - 493, 1955.
5. 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.
6. GILLILAND, S. E. & SPECK, M. L. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. **J. Dairy Sci.**, v. 60, p. 1394 - 1398, 1977.
7. KANDLER, O. & WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ª ed. Baltimore, The williams and wilkins Co., 1986. p. 1208 - 1234.
8. NORRIS, J. R., RIBBONS, D. W. **Methods in microbiology**. Academia Press, London and N.Y., v. 6A, 1971. 234p.
9. PELCZAR, M. J., REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo. Ed. Mcgraw. Hill do Brasil. 2 Vol., 1981. 1072p.
10. ROGOSA, M. Gram-positive, osporogenous, rodshaped bacteria. In: BUCHANAN, R. E., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8 ed. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1974. p. 576 - 593.
11. SKERMAN, V. B. D. **A guide to the identification of the genera of bacteria**. The Williams and wilkins Co. Baltimore, 1959, 217p.
12. SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, 2º ed., Washington DC, 1984. p. 409.

QUADRO 1. Caracterização dos isolados por fermentação de substratos.

Isolados	"Carboidratos"												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
LT 154A*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 156B*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-

LT 158A*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 346	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 347	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 359*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 351	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 360*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 361*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 481	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 482*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
LT 484*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 486	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 510*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 511	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 512	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 515	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 516*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 518*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 520*	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 521	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 523	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LT 525	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Comercial	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
#	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	(±)	-

→ KANDLER e WEISS (1986)

(±) → Resultados variáveis

Comercial → *Lactobacillus acidophilus* comercial

* → Identificados como *Lactobacillus acidophilus* após o teste API

- | | |
|---------------|---------------|
| 1 - Arabinose | 8 - Maltose |
| 2 - Celobiose | 9 - Maiose |
| 3 - Esculina | 10 - Sacarose |
| 4 - Frutose | 11 - Salicina |
| 5 - Galactose | 12 - Sorbitol |
| 6 - Glicose | 13 - Xilose |
| 7 - Manitol | |