

Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores

Resistance of lactic acid bacteria pig' isolated in faeces and their antagonistic capacity against indicative microorganisms

Aurélia Dornelas de Oliveira Martins^{1*}, Regina Célia Santos Mendonça², Daniela Leocádio Silva³, Michelle Silva Ramos³, Mauro César Martins³, Juarez Lopes Donzele⁴, Nélcio José de Andrade²

Recebido em 10/04/2006; aprovado em 11/08/2006.

RESUMO

Bactérias do ácido láctico (BAL) foram isoladas das fezes de aproximadamente 40 suínos sadios e em diferentes idades. Os isolados foram previamente selecionados com base na coloração das colônias em ágar All Purpose Tween (APT) modificado pelo acréscimo de 0,004% de púrpura de bromocresol e 0,5% de carbonato de cálcio, morfologia, coloração em Gram e atividade de catalase. Das bactérias lácticas isoladas, aproximadamente 50% das colônias apresentaram morfologia de cocos/bastonetes Gram-positivo, catalase negativa e colônias amareladas quando cultivadas em ágar APT modificado, sendo, portanto, classificadas como BAL. Estes isolados foram comparados pela sua habilidade em resistirem a pH 3,0, crescerem na presença de sais biliares por 3 horas e pela sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores (*Salmonella typhi* ATCC 6539, *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433). Apenas 18% dos isolados obtiveram menos que 1 Redução Decimal (RD) quando cultivados na presença de pH 3,0. Cerca de 36,5% reduziram entre 1 e 2 RD e 45,5% tiveram mais que 2 RD. Nenhuma das cepas avaliadas teve capacidade de crescer em meios específicos com o pH ajustado para 3,0. Cerca

de 36,5% dos isolados cresceram em meio de cultivo adicionado de 0,3% de sais biliares, 59% tiveram redução decimal menor ou igual a 2 e 4,5% maior que 2 RD. Os 12 isolados que apresentaram maior resistência ao pH 3,0 e que responderam melhor em meio de cultivo acrescido de sais biliares foram selecionados para análise de antagonismo. Nos teste de antagonismo entre os próprios lactobacilos isolados nenhum halo de inibição foi detectado, indicando a possibilidade de serem cultivados simultaneamente para produção de um probiótico. Todas as cepas avaliadas levaram a formação de halo de inibição sobre pelo menos dois dos microrganismos indicadores testados.

PALAVRAS-CHAVE: antagonismo, monogástricos, pH, probiótico, sais de bile, suínos.

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) were isolated from the faeces of nearly 40 healthy pigs, with different ages. The isolates were selected previously, based on the coloration in All Purpose Tween (APT) agar modified by the addition of 0,004% of purple bromocresol and 0,5% of calcium carbonate, on their morphology and on the coloration in gram and catalase activity. Approximately 50% of the isolated colonies presented

1* Estudante de doutorado do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA). Autor para correspondência, fone: 31 3531 5778, e-mail: mauroeurelia@yahoo.com.br, Rua 15 de novembro, nº 220 aptº 101, Centro, CEP 36500-000, Ubá, Minas Gerais, Brasil.

2 Professor(a) titular do DTA.

3 Estudantes de graduação do DTA

4 Professor titular do Departamento de Zootecnia (DZO), Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, 36570-00. Vicoso. Minas Gerais. Brasil.

morphology of Gram-positive cocos/bastonetes, negative catalase and yellow colonies when cultivated in modified APT agar, being classified as LAB. These isolates of pig faeces were compared by their ability to resist the pH 3.0, to grow in the presence of bile salts for 3 hours and by their antagonistic capacity against the indicative microorganisms (*Salmonella typhi* ATCC 6539, *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus faecalis* ATCC 19433). Only 18% of the isolates presented less than 1 Decimal Reduction (DR) when cultivated in the presence of pH 3.0. Nearly 36.5% reduced from 1 to 2 DR and 45.5% had more than 2 DR. No isolate had the capacity to grow in specific means with the adjusted pH for 3.0. About 36.5% of the isolates grew in cultivation medium modified with the addition of 0.3% of bile salts, 59% of isolates had decimal reduction smaller or equal to 2 and 4.5% presented decimal reduction larger than 2 DR. The 12 isolates that presented larger resistance to the pH 3.0 and resisted in cultivation medium added of bile salts were selected for the antagonism analysis. No inhibition halo was detected among the isolates, indicating a possible simultaneous growth to produce a probiotic. All the evaluated isolates produced an inhibition halo on at least two of the tested indicative microorganisms.

KEY WORDS: antagonism, monogastric, pH, bile salts, probiotic, pig.

INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico (BAL) são caracterizadas como Gram-positivas, não esporulantes e, normalmente, não móveis, que produzem ácido láctico como o maior ou o único produto de fermentação da glicose. Crescem anaerobicamente, porém a maioria não é sensível ao O₂ e podem crescer tanto em sua presença quanto em sua ausência, sendo então anaeróbios aerotolerantes (BROCK et al., 1994).

As BAL desempenham um importante papel na fermentação contribuindo para uma maior variedade de alimentos. Além de suas características

sensoriais, permitem uma maior conservação dos alimentos e ainda podem ser usadas como probiótico.

Probióticos são bactérias vivas contidas nos alimentos, e, após ingestão exercem efeitos benéficos ao hospedeiro. Os microrganismos mais comuns encontrados nos alimentos com probiótico são lactobacilos e bifidobactérias (CEBECI e GUARAKAN, 2003). Para que o probiótico produza benefícios terapêuticos, é recomendado que o alimento tenha aproximadamente 10⁶ microrganismos vivos por g ou mL do produto no momento do consumo (SHAH, 2000).

O uso de bactérias geneticamente modificadas tem sido promissor. Bactérias do ácido láctico geneticamente modificadas têm sido usadas para inibir patógenos intestinais como *E. coli*. Vários autores avaliaram a eficácia de probióticos como promotores de crescimento em monogástricos, mais especificamente em suínos e a maioria concluiu que há uma melhoria na taxa de crescimento e na eficiência da utilização do alimento, mas que os resultados são variáveis. As variabilidades dos resultados das pesquisas realizadas com probióticos podem estar associadas com as diferentes cepas, nível de dose, condição de armazenamento, composição de dieta, estratégia de alimentação e interações com drogas (CLOSE, 2000).

Probióticos têm sido utilizados como uma alternativa ao uso de antibióticos na dieta de monogástricos. A ingestão dos probióticos é feita na forma de preparações farmacêuticas como cápsula ou sachê, de alimentos fermentados como iogurte, leite “acidófilus” ou suplementado como o leite em pó adicionado de células vivas. Não são conhecidos probióticos capazes de se instalarem no ecossistema digestivo mesmo após uma ingestão prolongada, já que a microbiota local, mesmo desequilibrada, impede essa colonização (NICOLI et al., 2003).

Outra importante característica das BAL é a produção de bacteriocinas e peptídeos bacterianos ou proteínas ativas, que agem contra outras bactérias Gram-positivas (CLOSE, 2000).

O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos, como ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico que são produzidos pelas BAL são bem conhecidos. Uma ação dos ácidos orgânicos consiste em baixar

o pH até intervalos que inibam o metabolismo microbiano. Na forma não dissociada, esses ácidos são facilmente solúveis na membrana celular e desta forma interferem em sua permeabilidade inibindo o transporte ativo (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

As bacteriocinas são peptídeos complexos ativos, que são sintetizados nos ribossomos da célula bacteriana e são lançados extracelularmente apresentando atividade bactericida ou bacteriostática (GARNEAU et al., 2002). Embora as bacteriocinas possam ser produzidas por diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as produzidas pelas BAL tem tido atenção particular nos anos recentes, devido ao seu potencial de aplicação na indústria de alimentos como preservativo natural (RODRÍGUEZ et al., 2003). Cada bacteriocina possui um espectro de inibição específico.

Tradicionalmente, as bacteriocinas produzidas pelas BAL são divididas em três grupos: Classe I: Lantibióticos – que são peptídeos pequenos, caracterizados pela presença de aminoácidos como pouco comuns como lantionina, β -metil alanina e α , β aminoácidos não saturados como dehidroalanina e dehidrobutirina; Classe II: compreende um grande número de peptídeos não modificados e que são estáveis ao calor. Nesta classe incluem-se a pediocina, bacteriocina ativa contra *Listeria*, as plantaricinas, bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum*, entre outras (SULLIVAN et al., 2002); Classe III: encontram-se as helveticinas, produzidas por *Lactobacillus helveticus* (RODRÍGUEZ et al., 2003). Seu modo de ação é complexo. As bacteriocinas mais estudadas (nisina e pediocina) atuam destruindo a integridade da membrana citoplasmática através da formação de poros, provocando a saída de compostos pequenos ou altera a força próton-motora necessária para a produção de energia e síntese de proteínas (MONTVILLE e CHEN, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência ao pH baixo, aos sais de bile e as propriedades antagonicas *in vitro* de cepas de bactérias do ácido láctico isoladas a partir de fezes de suínos frente a diferentes microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os microrganismos foram isolados das fezes de aproximadamente 40 suínos sadios e em diferentes idades. Os isolados foram previamente selecionados com base na coloração das colônias desenvolvida em ágar All Purpose Tween (APT-Merck) modificado pelo acréscimo de 0,004% de púrpura de bromocresol e 0,5% de carbonato de cálcio, morfologia, coloração Gram e atividade de catalase. Colônias que obedeciam aos critérios de seleção foram congeladas a -80°C em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS-Merck) acrescido de 30% de glicerol para análises posteriores.

Resistência ao pH 3,00

Os isolados foram ativados duas vezes consecutivas em caldo MRS e incubados a 37°C por 24 h. Uma alíquota de 1 mL de cultura contendo cerca de 10^8 UFC/mL foi adicionada em 10 mL de caldo MRS com o pH ajustado a 3,00 com HCl 0,2 N. A contagem de células viáveis foi realizada após 3 horas do inoculação da cultura neste meio. Posteriormente, estes mesmos microrganismos foram avaliados quanto ao crescimento em presença de sais de bile.

Tolerância aos sais de bile

Para a avaliação da habilidade de crescimento na presença de sais de bile usou-se uma modificação da metodologia descrito em Du Toit et al. (1998). As BAL foram crescidas em caldo MRS suplementado com 0,3% de sais de bile (p/v) (Bacto-bile salts – Difco) e 0,3% (p/v) de esculina (Difco). Tubos contendo 10 mL do meio de cultura foi inoculado com 1 mL de uma cultura de 18 horas. Os tubos foram incubados a 37°C por 3 horas e as células viáveis contadas em ágar MRS (Merck).

Antagonismo entre isolados

Os isolados foram ativados duas vezes em caldo MRS e o número de células para o ensaio de antagonismo foi padronizado segundo a escala 1,0 de Marc-Farland. Ao atingirem o número de células desejadas, foram aplicadas à superfície do ágar MRS de acordo com o procedimento descrito a seguir: em cada placa este foram aplicadas microgotas (5 μL),

equidistantes entre si, de suspensões de três isolados a serem testados. Após a secagem destas microgotas, verteu-se uma sobrecamada de 7 mL de ágar MRS, semi-sólido, mantido em banho-maria a 47°C, contendo um quarto isolado não presente nas microgotas, também com crescimento padronizado para 1,0 na escala de Marc-Farland. Dessa forma foram testadas todas as combinações possíveis entre os isolados. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas e os halos de inibição medidos.

Teste de antagonismo entre isolados e microrganismos indicadores

Foram utilizados como microrganismos indicadores *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. Os microrganismos indicadores e os isolados foram ativados em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid) e caldo MRS, respectivamente por 18 a 24 horas. Suspensões de três isolados foram aplicadas sobre em cada placa teste na forma de microgotas (5 µL), equidistantes entre si. Após a secagem destas microgotas, verteu-se uma sobrecamada de 7 mL de ágar BHI, semi-sólido, mantido em banho-maria a 47°C, contendo um microrganismo indicador. O crescimento microbiano foi padronizado para 1,0 na escala de Marc-Farland. Dessa forma foram testadas todas as combinações possíveis entre os isolados e microrganismos indicadores. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas e os halos de inibição medidos.

Os isolados que apresentarem maior zona de inibição para os microrganismos indicadores foram caracterizados pelo kit API 50 CHL (BioMereux, France) de acordo com as instruções do fabricante.

RESULTADOS

Dos isolados selecionados, aproximadamente 50% das colônias apresentaram morfologia de cocos/bastonetes Gram-positivos, catalase negativa e de coloração amareladas quando cultivadas em ágar APT modificado, sendo, portanto, classificadas como BAL.

Na avaliação do perfil de resistência a pH

baixo, apenas 18% dos isolados obtiveram menos que 1 RD (Redução Decimal) quando cultivados em meio com pH ajustado a 3,00. Cerca de 36,5% apresentaram RD entre 1 e 2 e 45,5% tiveram mais que 2 RD. Nenhum dos isolados avaliados teve capacidade de crescer em meios específicos com o pH ajustado para 3,0.

Cerca de 36,5% dos isolados cresceram em meio de cultivo adicionado de 0,3% de sais biliares, 59% tiveram redução decimal menor ou igual a 2 e 4,5% maior que 2 RD. Nenhum dos isolados estudados hidrolisaram a esculina.

As análises de antagonismo foram realizadas nos 12 isolados que apresentaram maior resistência ao pH 3,00 e que responderam melhor em meio de cultivo acrescido de sais biliares. Nas análises de antagonismo entre os isolados classificados como BAL nenhum halo de inibição foi detectado. Na avaliação do efeito antagônico frente aos microrganismos indicadores puderam ser observados diferentes halos de inibição conforme os resultados apresentados na Tabela 1.

DISCUSSÃO

O pH do estômago de suínos varia de aproximadamente 4,20 para animais de 10 dias a 2,80 para animais de 60 dias e o tempo de contato do alimento com as condições de acidez é, geralmente, em torno de 2 a 3 horas. Desta forma os resultados obtidos mostram que pelo menos 54,5% dos isolados são capazes de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal dos animais. Nas condições estudadas, tais microrganismos provavelmente serão capazes de resistir às condições do intestino e possivelmente colonizá-lo se administrados juntamente com a ração.

Du Toit et al. (1998), avaliaram a capacidade de *Lactobacillus* isolados das fezes de suínos crescerem em diferentes pHs e observou que algumas cepas analisadas tiveram capacidade de crescer em pH 3 e 4, em contrapartida, outras não resistiam a pH 3. Estes últimos isolados passariam pelo estômago, porém em menor número. Algumas cepas tiveram a vantagem de tolerarem condições mais ácidas, e sobreviveriam no estômago em casos extremos (pH 2,0). Picot e Lacroix (2004), simulando as condições

Tabela 1 - Efeito antagonista das bactérias do ácido láctico isoladas de suínos sobre microrganismos indicadores.

Isolados	Microrganismos				
	<i>C. jejuni</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>
A	-	12	4	8	7
B	-	7	2	5	9
C	4	11	4	5	4
D	-	6	-	4	-
E	5	12	4	10	9
F	6	13	3	11	10
G	4	5	-	-	-
H	4	7	-	-	4
I	3	6	4	5	4
J	-	6	3	9	4
K	4	-	1	5	8
L	-	-	3	9	-

Valores dos halos de inibição dados em mm.
 - : Ausência de inibição.

gastrointestinais de humanos, observaram que as bal, mais precisamente *bifidobacterium*, reduzem 6 ciclos log após 30 minutos de contato com pH 1,9.

As BAL ácido-tolerantes e bile-tolerantes podem ser isoladas sob condições de estresse. A tolerância ao pH baixo e bile não podem ser generalizados, são específicos de cada microrganismo, podendo ocorrer variabilidade de resistência entre gêneros ou espécies.

Du Toit et al. (1998), isolando lactobacillus das fezes de suínos observaram que nem todas as cepas apresentaram crescimento na presença de sais biliares, das cepas encontradas, estes autores constataram que 64,3% tiveram capacidade de hidrolisar sais biliares. Picot e Lacroix (2004), observaram que *Bifidobacterium breve* na presença de sais de bile possuem capacidade de crescerem cerca de 5 ciclos log após 6 horas de incubação a pH 7,5.

É difícil simular com exatidão em laboratório todos os parâmetros que afetam a sobrevivência do microrganismo in vivo. Um fator importante a ser considerado é que a resistência ao ácido e à bile varia entre espécies e quando são feitas transferências desses microrganismos para o meio de cultura nem todas as células permanecem viáveis. Chateau et al. (1994) avaliando o efeito dos sais de bile em 38 cepas de *Lactobacillus* (principalmente *L. rhamnosus*) isolados de probióticos observaram variação de

sensibilidade. Das 22 cepas de *L. rhamnosus*, 3 foram classificadas como resistentes, 5 como tolerantes, 3 com baixa tolerância e 11 como sensíveis. Esta variabilidade também foi constatada por Du Toit et al. (1998). Gilliland et al. (1984) mostraram que cepas de *Lactobacillus* resistentes à bile sobrevivem em maiores números no intestino delgado.

A presença de alimentos no intestino é outro fator que pode afetar a sobrevivência dos microrganismos. As bactérias podem não ficar expostas aos sais de bile, uma vez que o alimento pode interagir com os ácidos biliares evitando desta forma que estes exerçam sua toxicidade.

Nas análises de antagonismo entre os isolados classificados como BAL nenhum halo de inibição foi detectado, indicando a possibilidade de cultivo simultâneo.

Todas as cepas avaliadas levaram a formação de halo de inibição sobre pelo menos dois dos microrganismos indicadores testados. Esse resultado contrasta com os encontrados por Dabés et al. (2001), que isolando BAL de produtos cárneos, encontraram que 79,5% das cepas estudadas não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados.

Das 12 cepas de bactérias lácticas avaliadas, 58,3% levaram a formação de halo de inibição sobre *C. jejuni*. Resultado também encontrado por

Chaverach et al. (2004), que avaliando a atividade antagonista de bactérias frente ao crescimento de *C. jejuni* e *C. coli*, demonstraram que *Lactobacillus* (P93) tem propriedades probióticas contra cepas de *Campylobacter*, porém seu mecanismo de ação não é exatamente conhecido.

Cerca de 75% das bactérias lácticas apresentaram atividade contra *S. aureus*, resultado superior ao encontrado por Dabés et al. (2001), que analisando a atividade das BAL isoladas de produtos cárneos, encontrou que 13,5% destas inibiam o crescimento de *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana das BAL isoladas sobre *E. coli* e *S. typhi* foi de 83,3%, mostrando que a maioria dos isolados são efetivos contra esses dois microrganismos. Gopal et al. (2001), observaram zonas claras de mesmo diâmetro ao redor de *E. coli*, na presença de *L. rhamnosus* DR20 e *L. acidophilus*, indicando níveis similares de inibição. Tsai et al. (2005), observou que quando *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *S. aureus* foram usadas como bactérias indicadoras, *L. acidophilus* isolado de suínos inibiu o crescimento dessas bactérias.

Dos isolados apenas três não inibiram o crescimento de *E. faecalis*. *Enterococcus* tem como habitat predominante o trato gastrointestinal de humanos e animais e ainda podem ser utilizados como probióticos. Os halos de inibição para esse microrganismo variou de 1 a 4 mm, sendo os menores existentes nesse experimento.

Como as condições do intestino grosso são anaeróbias (BROCK et al., 1994), provavelmente em anaerobiose a velocidade de crescimento das BAL é maior, implicando em maior halo de inibição nestas condições. Portanto, os halos de inibição podem ser maiores que os encontrados em condições de aerobiose.

O antagonismo observado pelos isolados pode ser devido à produção de ácidos, peróxido de hidrogênio ou bacteriocina (substância de natureza protéica). Como as BAL não sintetizam catalase, enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio gerado na presença de O₂, o peróxido de hidrogênio pode acumular no meio de crescimento e inibir vários microrganismos (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

Os ácidos orgânicos, inclusive o ácido láctico, agem inibindo os microrganismos porque abaixam o pH do meio e também podem atuar na sua forma não dissociada. O pKa do ácido láctico é 3,1, o que significa que neste valor 50% do ácido se encontra na forma não dissociada e nesta forma atravessa a membrana celular interferindo na sua permeabilidade, inibindo o transporte ativo e promovendo a acidificação do conteúdo celular (CLIVER e MARTH, 1990).

Somente quatro isolados apresentaram halos de inibição contra todos os indicadores, concluindo-se que essas cepas apresentaram amplo espectro de atividade frente a bactérias de gêneros diferentes. Dessas, as duas que apresentaram maior halo de inibição para todos os microrganismos indicadores foram identificados pelo kit API 50 CHL como *Lactobacillus plantarum* (cepa E) e *Lactobacillus brevis* (cepa F).

A atividade frente aos microrganismos indicadores pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio pelos dois microrganismos. Quanto ao *L. plantarum*, possui um fator adicional que é a produção de uma bacteriocina, a plantaricina, que pode ter efeito inibidor sobre os microrganismos indicadores avaliados.

Para os microrganismos serem utilizados como probióticos é necessário que estes sejam tolerantes às condições ácidas, resistindo desta forma às condições predominantes no estômago e à bile quando no início do intestino delgado. Por outro lado, é necessária a capacidade de inibição da microbiota patogênica autóctone passível de ser encontrada no trato gastrointestinal dos animais as quais podem vir a ser um problema de saúde animal e humana no consumo desta carne.

CONCLUSÃO

Os isolados identificados neste estudo se apresentam com boas características para uso como probiótico uma vez que cumprem de modo eficiente as características desejadas no processo de seleção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. et al. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, 1994. 909p.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v.50, n. 1-2, p.131-149, 1999.
- CEBECI, A.; GURAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains, **Food Microbiology**, v.20, p.511-518, 2003.
- CHATEAU, N., DESCHAMPS, A.M.; HADJ SASSI, A. Heterogeneity of bile salts of *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. **Letters Applied Microbiology**, v.18, p.42-44, 1994.
- CHAVEERACH, P.; LIPMAN, L.J.A.; VAN-KNAPEN, F. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*, **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.43-50, 2004.
- CLIVER, D.O., MARTH, E.H. Preservation, sanitation and microbiological specifications for food. In: CLIVER D.O. (Ed). **Foodborne disease**, Califórnia: Academic Press, 1990. p.85-106.
- CLOSE, W.H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. **Advances in Pork Production**, v.11, p.47-56, 2000.
- DABÉS, A.C.; SANTOS, W.L.M.; PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.136-140, 2001.
- DU TOIT, M., FRANZ, C.M.A.P., DICKS, L.M.T. et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content, **International Journal Food Microbiology**, v.40, p.93-104, 1998.
- GARNEAU, S., MARTIN, N.I. VEREDAS, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.84, p.577-593, 2002.
- GILLILAND, S.E., STALEY, T.E., BUSH, L.J. Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct, **Journal Dairy Science**, v.67, p.3045-3051, 1984.
- GOPAL, P.K. et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR 20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.207-216, 2001.
- MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions **Applied Microbiology Biotechnology**, v.50 p.511-519, 1998.
- NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C., PENNA, F.J. et al. Probióticos: Moduladores do ecossistema digestivo In: **Microbiologia de Alimentos, qualidade e segurança na produção e consumo**, p. 115-128, 2003.
- RODRÍGUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, M.I.; HORN, N.; DODD, H.M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.101- 116, 2003.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, **International Dairy Journal**, v.14, n.6, p.505-515, 2004.
- SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.
- SULLIVAN, L.O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v.84, p.593-604, 2002.
- TSAI, C.C. et al. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **International Journal Food Microbiology**, v.102, n.2, p.185-194, 2005.