

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PROVENIENTES DO LEITE DE TRANSIÇÃO BOVINO FERMENTADO

Fernanda Guimarães, Vanessa de Araujo Veloso, Danielle Soares Malveira, Hugo Calixto Fonseca, Maximiliano Soares Pinto, Roberta Torres Careli e Eduardo Robson Duarte

RESUMO

O leite de transição de bovinos fermentado é rico em nutrientes e apresenta elevada população de bactérias ácido lácticas (BAL). Caracterizou-se a população de BAL no leite de transição fermentado em função do dia de coleta após o parto e selecionou-se *Lactobacillus spp.* com potencial probiótico e fermentativo para essa matéria prima. Para seleção desses microrganismos analisou-se a produção de catalase, Gram e aspectos morfológicos das colônias. Foram selecionados três morfotipos que apresentaram resistência aos sais biliares nas

concentrações de 0,3; 0,5 e 1%, resistência ao ácido clorídrico e que apresentaram perfis bioquímicos compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*. Avaliou-se o antagonismo para três amostras de *Escherichia coli* provenientes de bezerros com diarreia o qual foi maior para um isolado. Futuros estudos in vivo podem apontar esse isolado como aditivo microbiano para favorecer a fermentação de leite de transição, contribuindo para o armazenamento desse alimento e para o controle de diarreias em bezerros.

Introdução

A primeira secreção da glândula mamária é denominada 'coloostro' (Machado Neto *et al.*, 2004) e a partir da segunda ordenha após o parto essa secreção passa por transformações nutricionais até atingir gradualmente a composição do leite e é denominada como 'leite de transição' (LT) (Wattiaux, 1996; Azevedo *et al.*, 2014).

O LT excedente é importante alternativa para o aleitamento artificial de bezerros, por apresentar elevados níveis proteicos e energéticos. Essa matéria prima pode ser conservada anaerobicamente em garrafas de plástico de

politereftalato de etileno (PET), técnica conhecida como silagem de colostro (Saalfeld, 2008). Esse processo de armazenamento é simples e dependente de bactérias lácticas (Saalfeld, 2008; Azevedo e Duarte, 2013).

Entretanto, fermentações em regiões tropicais podem ocorrer perdas por excesso de produção de gases, putrefação ou alteração de acidificação. Silagens de LT *in natura* podem apresentar perdas com taxa de descarte superior a 90% para secreções provenientes da segunda ordenha após o parto. Enquanto, que garrafas fermentadas com leite de transição do 3º ao 6º dia apresentaram taxa de fermentação

adequada superior a 95%. Com a elevação dos teores de lactose ocorre o favorecimento do crescimento de BAL, que produzem ácido láctico e inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis (Azevedo *et al.*, 2014). O gênero *Lactobacillus* representa importante grupo de BAL com propriedades probióticas em alimentos para humanos e animais (Agaliya e Jeevaratnam 2013) e já foi identificado em colostro bovino fermentado durante até 360 dias (Saalfeld *et al.*, 2013), contribuindo para a conservação da silagem.

A diarreia em bezerros ocasionada por cepas de *E. coli* enterotoxigênicas ocorre em animais mais jovens, nos primei-

ros dias de vida, desencadeando desidratação e frequentemente morte (Salvadori *et al.*, 2003). Para o tratamento e controle, são administrados antibacterianos. No entanto, a toxicidade, alergias e o favorecimento à resistência têm fomentado o interesse por probióticos, como alternativa à antibioticoterapia (Duse *et al.*, 2015).

Probióticos contendo *Lactobacillus spp.* tem contribuído para melhorar o estado de saúde de bezerros recém-nascidos (Maldonado *et al.*, 2012; Bayatkouhsara *et al.*, 2013). A seleção e adição de cepas dessas bactérias com melhor potencial fermentativo para o leite de transição contribuiria para reduzir perdas durante a

PALAVRAS CHAVE / Antagonismo Bacteriano / Bactérias Ácido Lácticas / Caracterização Bioquímica / Colibacilose em Bezerros / *Lactobacillus spp.* /

Recebido: 05/03/2017. Modificado: 03/02/2018. Aceito: 06/02/2018.

Fernanda Guimarães. Graduação em Engenharia de Alimentos e Mestranda em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.

Vanessa de Araujo Veloso. Graduação em Engenharia de Alimentos e Mestranda em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.

Danielle Soares Malveira. Graduação em Engenharia de

Alimentos, Faculdades Integradas do Norte de Minas (FUNORTE), Brasil. Mestre em Produção Animal Sustentável, UFMG, Brasil. Professora, FUNORTE, Brasil.

Hugo Calixto Fonseca. Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdades Integradas do Norte de Minas (FUNORTE), Brasil. Mestre em Produção Animal, UFMG, Brasil. Técnico de Laboratório, UFMG, Brasil.

Maximiliano Soares Pinto. Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios, Mestre e Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Professor, UFMG, Brasil.

Roberta Torres Careli. Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios, Mestre e Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Professora, UFMG, Brasil.

Eduardo Robson Duarte. Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Microbiologia, UFMG, Brasil. Professor, UFMG, Brasil. Endereço: Instituto de Ciências Agárias, UFMG. Avenida Universitária, Universitário 39404547 - Montes Claros, MG - Brasil. e-mail:

SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DE LECHE DE TRANSICIÓN BOVINO FERMENTADO

Fernanda Guimarães, Vanessa de Araujo Veloso, Danielle Soares Malveira, Hugo Calixto Fonseca Maximiliano Soares Pinto, Roberta Torres Careli y Eduardo Robson Duarte

RESUMEN

La leche de transición de vaca fermentada es rica en nutrientes y tiene una alta población de bacterias ácido lácticas (BAL). Se caracterizó la población de BAL en leche de transición fermentada de acuerdo con el día de nacimiento posparto y fue seleccionado *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico y de fermentación de esta materia prima. Para la selección de estos microorganismos fueron analizadas la producción de catalasa, Gram y los aspectos morfológicos de las colonias. Tres morfotipos fueron seleccionados y mostraron resistencia a sa-

les biliares en concentraciones de 0,3; 0,5 y 1%, resistencia al ácido clorhídrico y perfiles bioquímicos compatibles con la especie *Lactobacillus brevis*. Se evaluó el antagonismo con tres cepas de *Escherichia coli* a partir de terneros con diarrea y uno de los aislados mostró mayor antagonismo. Futuros estudios in vivo podrían señalar a este aislado como aditivo microbiano para promover una mejor fermentación de la leche de transición, lo que contribuirá a su almacenamiento y al control de la diarrea en terneros.

SELECTION OF LACTIC BACTERIA WITH PROBIOTIC POTENTIAL FROM FERMENTED BOVINE TRANSITION MILK

Fernanda Guimarães, Vanessa de Araujo Veloso, Danielle Soares Malveira, Hugo Calixto Fonseca Maximiliano Soares Pinto, Roberta Torres Careli and Eduardo Robson Duarte

SUMMARY

Fermented bovine transition milk is rich in nutrients and has a high population of lactic acid bacteria (LAB). The LAB population in the fermented transition milk was characterized according to the day of collection after calving and its probiotic and fermentative potential. The production of catalase, Gram and morphological aspects of the colonies were evaluated for the selection of *Lactobacillus* spp. Three morphotypes were chosen which showed resistance to bile salts at concentrations

of 0.3, 0.5 and 1%, resistance to hydrochloric acid, and presented biochemical profiles compatible with the *Lactobacillus brevis* species. Antagonism was evaluated for three *Escherichia coli* samples from calves with diarrhea and one isolate proved better than the others. Future in vivo studies may point to the selected isolate as a microbial additive to favor transition milk fermentation, contributing to the storage of this food and to the control diarrhea in calves.

estocagem e adicionalmente essas cepas poderiam controlar a população de bactérias patogênicas causadoras de diarrea em bezerros. Nesta pesquisa objetivou-se a seleção e caracterização de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de leite de transição bovino fermentado.

Materiais e Métodos

Coleta do material

O leite de transição (LT) utilizado foi obtido na ordenha mecânica de quatro vacas Holandesas, sem mastite, entre o 3º e o 6º dia após o parto, criadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, Montes Claros, Norte de Minas Gerais, Brasil, no mês de março. Após a coleta, a mistura do LT dos quartos mamários de cada animal foi transferida para garrafas higienizadas do tipo *pet* de 2

litros para fermentação durante 141 dias conforme descrito por Azevedo *et al.* (2013). O material coletado foi armazenado em galpão experimental cuja temperatura média foi de 22,67°C, com máximas e mínimas de 26,4 e 18,1°C, respectivamente e sem incidência direta de luz solar (Azevedo *et al.*, 2013).

Para cada um dos quatro períodos após o parto, foram selecionadas quatro garrafas, sendo cada uma proveniente de uma das vacas, correspondendo a quatro repetições para cada dia após o parto, totalizando 16 amostras com o leite fermentado, apresentando boa aparência, odor agradável e separação adequada do coágulo e da gordura conforme descrito por Saalfeld (2008).

Isolamento e seleção de bactérias ácido lácticas

Para o cultivo microbiano, o material das garrafas foi homo-

geneizado e alíquotas de 1ml foram diluídas em tubos contendo 9ml de solução salina. Posteriormente, alíquotas de 0,1ml foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios Ágar MRS, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Sal Manitol para determinação de bactérias ácido lácticas (BAL), enterobactérias, fungos e leveduras, e *Staphylococcus* spp., respectivamente. As placas contendo meio MRS foram colocadas em jaras de anaerobiose e a incubação ocorreu em estufa BOD a 37°C por 48h e posteriormente realizou-se a contagem das colônias.

Foram realizadas análises para determinação do pH e acidez titulável em função do dia de coleta do LT. Entre as colônias de bactérias lácticas que cresceram no meio MRS foram selecionados morfotipos diferentes e conservados em duplicatas em tubos contendo caldo MRS; BHI e glicerol a -80°C. Foram

preparados esfregaços em lâminas coradas pelo método de Gram para cada morfotipo, de cada amostra. Todos os isolados que apresentaram formas de bastonetes Gram positivos não esporulados foram selecionados e submetidos a prova de catalase (n=32), selecionando os catalase negativo (Bujnakova *et al.*, 2014).

Os dados de contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) foram avaliados em função dos dias de lactação após o parto e de acordo com as morfologias predominantes. Esses dados foram transformados para log₁₀ e as médias de contagens bacterianas foram comparadas pelo teste de Duncan no pacote estatístico SAEG, considerando o nível de significância de 5%.

Perfil de fermentação de bactérias ácido lácticas

Para verificar o perfil de fermentação do LT e selecionar

BAL fermentativas, coletou-se o LT no quarto dia após o parto dos quartos mamários de uma vaca Holandesa, sem mastite. As amostras foram acondicionadas em Erlenmeyer de 2 litros esterilizado. Após a homogeneização, 1ml de LT foi submetido a diluições decimais para avaliar a contaminação inicial de enterobactérias, fungos filamentosos, leveduras e *Staphylococcus* spp. O inóculo foi preparado a partir de seis cepas de bactérias lácticas predominantes e selecionadas do experimento anterior que foram conservadas em caldo BHI. Foram duas cepas de cada um dos morfotipos obtidos anteriormente. Os tipos foram denominados de acordo com o morfotipo das colônias, A1 e A2 (pequena branca, não achatada), B1 e B2 (pequena, achatada, branca) e C1 e C2 (grande branca).

Inoculou-se 2ml do meio BHI contendo a cepa ativada das bactérias lácticas em tubos de ensaio de rosca contendo 18ml de LT do quarto dia, com concentração $\sim 10^7$ UFC/ml. Após homogeneização o tubo foi vedado e incubado em estufa BOD a 37°C por 33 dias. Esse procedimento foi realizado com quatro repetições. Após a incubação, foram promovidas análises de odor, pH e acidez titulável.

Posteriormente a essas análises, as amostras A1, B1 e C1 foram selecionadas por apresentarem silagem com três fases distintas de fermentação, coágulos compactos e bem formados, odor característico, pH entre 4,31 e 4,52.

Caracterização bioquímica

Para caracterização bioquímica dos três isolados selecionados, promoveu-se a análise em galerias API 50 CHL (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile/ França). Esse kit permite avaliar a capacidade de fermentação de 49 carboidratos e derivados. Para análise dos resultados, utilizou-se o programa de probabilidade LAB PLUS software version 4.0 database da Biomérieux (2012).

Resistência a sais biliares

Verificou a resistência aos sais biliares para os três morfotipos de bactérias lácticas selecionadas nas etapas anteriores. Para o estudo de viabilidade às diferentes concentrações de sais biliares, foram inoculados 100µl do inóculo em ágar MRS, contendo 0; 0,3; 0,5 e 1,0% de sais biliares. Após incubação a 37°C durante 48h em jarra de anaerobiose, o crescimento das colônias frente aos sais biliares foi observado visualmente, com presença ou ausência da bactéria. Os procedimentos foram realizados em duplicata e foram adaptados de Noh e Gilliland (1993).

Resistência a pH ácido

Para avaliar 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 estéril PA, utilizando-se um pHmetro digital. Os isolados, previamente cultivados em caldo BHI, em fase exponencial, foram inoculados em proporção de 5% para cada meio contendo o pH avaliado. A incubação ocorreu a 37°C e o crescimento foi avaliado após 6h de exposição ao caldo BHI acidificado. Após esse período, foram inoculados 50µl desse meio acidificado em placas contendo ágar MRS e espalhados com alça de Drigalski. Os materiais foram cultivados em anaerobiose a 37°C e após 48h observou-se visualmente o crescimento comparando com o controle em pH 7. Foi definido o padrão ++++ (100%) representando o crescimento no controle com pH 7, e +++, ++

e +, respectivamente, para 75, 50 e 25% do crescimento (Malveira *et al.*, 2016).

Antagonismo

O efeito antagonista dos isolados selecionados foi avaliado para três isolados de *Escherichia coli* como bactérias reveladoras, sendo uma cepa ATCC 25922 (E1). O segundo isolado foi proveniente de fezes de bezerra com um mês de idade (E2) e o terceiro proveniente do intestino delgado de bezerro macho com dois meses de idade (E3), sendo que ambos bovinos apresentavam diarreia. Os isolados dos bezeros foram obtidos em cultivos contendo o meio sólido MacConkey e identificados presuntivamente, utilizando-se o meio Rugai Modificado. Foram também identificados pelo sequenciamento dos fragmentos 16S e 23S do DNA ribossomal (Reysenbach *et al.*, 2000; Chapaval *et al.*, 2008). A inibição do crescimento dessas bactérias patogênicas foi verificada com adaptação do método descrito por Tagg e Mc Given (1971). As culturas puras de cada isolado de *E. coli*, em fase exponencial, foram inoculadas em toda a superfície de uma placa 90x150mm contendo ágar Mueller Hinton, com o auxílio de um swab estéril. Posteriormente, discos de papel de filtro 6mm de diâmetro, impregnados com o caldo MRS contendo um dos isolados de bactérias lácticas cultivadas a 37°C durante 48h, foram aplicados sobre a superfície do ágar. Após o período de incubação de 48h, verificou-se a presença ou ausência de halos de inibição, bem como a mensuração dos

diâmetros dos halos produzidos (Chaves *et al.*, 1999).

Resultados e Discussão

Seleção de bactérias lácticas

Ao comparar a média de concentração de BAL do terceiro ao sexto dia, verificou-se que não houve diferença significativa para esses períodos de coleta e apresentaram elevada contagem ($5,79 \pm 0,79$ log UFC/ml). Essa contagem foi próxima daquelas observadas para fermentações adequadas do leite de transição bovino (Azevedo e Duarte 2013, Saalfeld *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2014).

Não houve crescimento de bastonetes Gram-negativo, fungos filamentosos e leveduras para os quatro períodos de coletas avaliados. Entretanto, a presença de *Staphylococcus* spp. somente não foi verificada para as amostras do sexto dia de coleta (Tabela I).

Saalfeld *et al.* (2013), em estudo de colostro fermentado anaerobicamente como alternativa para alimentação de bezerras, observaram que os microrganismos que se mantiveram viáveis até 360 dias foram bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. A presença de *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. e leveduras do gênero *Candida* spp. foi observada na silagem de colostro até 14 dias de fermentação. Entretanto, a partir de 21 dias foram isoladas apenas bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. Esses resultados poderiam ser justificados uma vez que a maioria das bactérias patogênicas não sobrevivem em condições ácidas (Hirsh *et al.*, 2003).

TABELA I
CONTAGEM MÉDIA (LOG) DE UFC/ml DE BASTONETES GRAM-NEGATIVO, FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS, *Staphylococcus* spp. E BAL EM SILAGEM DE LEITE DE TRANSIÇÃO DE ACORDO COM O PERÍODO DE COLETA APÓS O PARTO DE VACAS HOLANDESAS

Dia após o parto	Bastonetes Gram negativos	Fungos filamentosos e leveduras	<i>Staphylococcus</i> spp.	Contagem de BAL
Terceiro	-	-	1,60 ±0,94	5,85 ±0,90
Quarto	-	-	1,51 ±0,99	5,91 ±0,18
Quinto	-	-	1,07 ±0,08	5,68 ±0,22
Sexto	-	-	-	5,34 ±1,56
Média	-	-	-	5,70 ±0,74

Nesta pesquisa foram verificados três morfotipos de bactérias lácticas, considerando as características das colônias. Houve diferença significativa entre as concentrações dos três morfotipos de bactérias lácticas isoladas, com predomínio de colônias pequenas brancas, seguido das colônias pequenas achatadas (Tabela II).

Para os diferentes dias de coletas analisados, não se verificou diferença significativa entre as médias de pH e da acidez titulável do LT após a fermentação (Tabela III). Saalfeld *et al.* (2013), em estudo de colostro fermentado anaerobicamente, observaram que os valores de pH diminuíram após sete dias de fermentação, acompanhada pelo aumento de percentagem de ácido láctico, cujos valores encontrados com 60 dias de fermentação foram 4,0 e 28,7^oD de pH e ácido láctico, respectivamente. Na presente pesquisa as médias de pH foram menores o que poderia ser justificado pelo maior período de fermentação e armazenamento.

Características fermentativas

As características fermentativas do LT incubado com os seis isolados durante 33 dias diferiram entre as amostras utilizadas. O pH inicial do LT utilizado para a fermentação foi de 6,4 e quatro isolados promoveram redução desse valor para valores $\leq 4,4$. Entretanto a amostra C2 apresentou aspecto aquoso, odor forte, pH > 5 e média de acidez de 23,5^oD, e

TABELA III
MÉDIA DO pH E ÍNDICE DE ACIDEZ TITULÁVEL EM SILAGEM DE LEITE DE TRANSIÇÃO DE ACORDO PERÍODO DE COLETA APÓS O PARTO DE VACAS HOLANDESAS

Dia após o parto	pH	Acidez titulável (°D)
3 ^o	3,67 \pm 0,08	37,0 \pm 5,27
4 ^o	3,50 \pm 0,08	35,0 \pm 3,24
5 ^o	3,52 \pm 0,07	33,0 \pm 4,19
6 ^o	3,63 \pm 0,25	34,0 \pm 3,21

^oD: graus Dornic.

não foi selecionada para as próximas etapas (Tabela IV). A fermentação inadequada dessa amostra poderia ter ocorrido devido à menor produção de ácido láctico e o odor pútrido pode estar diretamente relacionado à presença de fungos na amostra (Azevedo *et al.*, 2014). Segundo esses autores foi observado que em amostras provenientes de garrafas com fermentações inadequadas, os cultivos indicaram positividade de 6,7% para Enterobacteriaceae, 33,3% para *Staphylococcus* spp. e 86,7% para fungos. Entre os fatores relacionados às perdas no armazenamento por fermentação do colostro bovino, a produção de gases, odor pútrido, pH mais elevado, são características de fermentações inadequadas que inviabilizam a utilização desse produto (Azevedo *et al.*, 2014).

A boa fermentação do LT é caracterizada pela formação de três fases distintas, coágulo

bem formado, aspecto aquoso a viscoso e odor característico de leite fermentado. A faixa ideal de pH para fermentação adequada e conservação do colostro é de 3,55 a 4,39, nessa faixa de pH ocorre fermentação adequada, permitindo boa conservação do material com redução do crescimento de microrganismos indesejáveis (Saalfeld, 2008).

Resistência a pH e a sais biliares

As cepas selecionadas dos três morfotipos (A1, B1 e C1) resistiram às concentrações de 0,3; 0,5 e 1% de sais biliares, crescendo de forma semelhante ao controle. Mangoni *et al.* (2011), ao avaliarem o crescimento de *Lactobacillus* spp. provenientes de fezes de suínos e cultivados em meio acrescido com 0,3% de sais de bile, observaram que apenas duas cepas foram resistentes.

Todas as amostras apresentaram bom crescimento no pH 5 e 7 ou seja 75% (+++) e 100% (++++) de acordo com o padrão estabelecido. Para o pH 3 e 4 o morfótipo que apresentou melhor crescimento foi A1 (pequena branca), pois apresentou crescimento de 50% (++) no pH 3. A amostra C1 apresentou crescimento de 25% (+) no pH 3 e 50% (++) no pH 4 (Tabela V).

Em estudo avaliando potencial probiótico de *Lactobacillus* de origem suína, observou que cinco isolados de *Lactobacillus* spp. resistiram ao pH 3,0 até o tempo de 3h, indicando que esses isolados poderiam suportar melhor a passagem pelo estômago do animal (Mangoni *et al.*, 2011). A sobrevivência ao pH ácido e a colonização no trato digestivo de microrganismos probióticos são aspectos críticos para o aumento da funcionalidade e a expressão de funções fisiológicas para promover à saúde aos animais (Meira *et al.*, 2010).

Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica indicou que os três isolados, apesar de apresentarem aspectos

morfológicos diferentes de colônias, apresentaram perfis catabólicos semelhantes, o que poderia ser justificado pela pressão seletiva durante o processo fermentativo do LT bovino. Os três isolados avaliados apresentaram características compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*.

Antagonismo

Observou-se halo de inibição apenas para o isolado A1 (pequena branca), inibindo as cepas de E1 e E2. O halo médio encontrado foi de 12mm para *E. coli* 1 e 15,4mm para *E. coli* 2. Esse resultado contrasta com os encontrados por Martins *et al.* (2006), que isolando BAL de suínos, reportaram que 10 dos 12 isolados apresentaram halo de inibição frente à bactéria *E. coli*, porém os valores apresentados foram de 5 a 13mm. Chaves *et al.* (1999) promoveram a seleção de isolados de *Lactobacillus acidophilus* usados como probiótico em bezerros e verificaram que quatro isolados apresentaram antagonismo considerado forte frente à *E. coli* enteropatogênica.

Segundo Martins *et al.* (2006), o antagonismo observado para BAL pode ser devido à produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas, o que deve ser analisado em futuras pesquisas para os isolados selecionados neste estudo.

Nesta pesquisa, a partir de um total de 32 isolados de BAL foi possível selecionar três cepas que apresentaram potencial para elaboração de aditivo para fermentação de leite de transição bovinos e probióticos para bezerros.

Conclusões

O leite de transição bovino com boa fermentação possui alta concentração de bactérias lácticas, pH ácido e baixa concentração de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Cinco das cepas selecionadas promovem boa fermentação ao leite de transição, indicando que a adição BAL selecionadas

TABELA II
CONCENTRAÇÃO MÉDIA (LOG) DE UFC/ml DE DIFERENTES MORFOTIPOS DE COLÔNIAS DE BAL PROVENIENTES DE SILAGEM DE LEITE DE TRANSIÇÃO DE ACORDO COM O PERÍODO DE COLETA, APÓS O PARTO DE VACAS HOLANDESAS

Dias de coleta	Pequenas e brancas	Pequenas, brancas achatadas	Grandes e brancas
Terceiro	5,73 \pm 0,09	3,25 \pm 2,60	2,64 \pm 1,89
Quarto	5,68 \pm 0,26	4,35 \pm 2,26	2,96 \pm 2,26
Quinto	5,33 \pm 0,30	4,39 \pm 2,27	1,99 \pm 1,97
Sexto	5,17 \pm 1,65	3,66 \pm 2,20	2,69 \pm 2,03
Media	5,48 \pm 0,80a	3,91 \pm 2,15b	2,57 \pm 1,86c

Letras minúsculas divergentes nas linhas indicam diferença significativa, estimada pelo teste de Duncan, com valores de $P < 0,05$. Coeficiente de variação = 42%

TABELA IV
ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS, ASPECTO,
ODOR, COÁGULO (CM), pH E ACIDEZ DO LEITE
DE TRANSIÇÃO INOCULADO E FERMENTADO
POR SEIS ISOLADOS DE *Lactobacillus* spp.

Cepas	Características do material fermentado	Aspecto	Odor	Coágulo (cm)	pH	Acidez (°D)
A1	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a viscoso	Normal	8,25	4,4	36
A2	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a viscoso	Forte	9,38	4,3	33
B1	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a médio	Normal	11,53	4,5	27,5
B2	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Médio a viscoso	Normal a forte	10,48	4,3	37,25
C1	75% das amostras apresentaram boa fermentação	Aquoso a viscoso	Normal	10,73	4,4	34
C2	Nenhuma amostra apresentou boa fermentação	Aquoso	Forte a podre*	2,75	5,4	15,3

*Odor forte ou podre: odor característico de alimento em putrefação e presença de enxofre.

TABELA V
RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE TRÊS MORFOTIPOS
DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROVENIENTES DE LEITE DE
TRANSIÇÃO BOVINO FERMENTADO EM pH 3, 4, 5 E 7 E
A SAIS BILIARES NAS CONCENTRAÇÕES 0; 0,3; 0,5 E 1%

Morfotipos/ Isolados	pH				Sal biliar			
	3	4	5	7	0 %	0,3%	0,5%	1%
A1	++	++++	++++	++++	+	+	+	+
B1	++	+++	++++	++++	+	+	+	+
C1	+	++	+++	++++	+	+	+	+

A1: pequena branca, B1: pequena branca achatada, e C1: grande branca. Para pH, ++++: 100%, +++: 75%, ++: 50%. e +: 25%. Para sal biliar, + indica crescimento.

poderia contribuir para melhor fermentação e conservação do leite de transição.

As cepas selecionadas, que apresentaram características bioquímicas compatíveis com a espécie *Lactobacillus brevis*, são resistentes a bile e pH ácido e uma delas apresentou efeito inibitório contra isolados de *E. coli* causadora de colibacilose em bezerros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem 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), e da Pró-reitoria de Graduação pelo Programa Especial de Bolsas Acadêmicas para Estudantes dos Cursos Noturnos de Graduação da UFMG.

REFERÊNCIAS

- Agaliya PJ, Jeevaratnam K (2013) Characterisation of the bacteriocins produced by two probiotic *Lactobacillus* isolates from idle batter. *Ann. Microb.* 63: 1525-1535.
- Azevedo RA, Guimarães F, Viegas CR, Almeida PNM, Gerasseev, LC, Pinto MS, Glória JR, Duarte ER (2014) Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. *Rev. Bras. Med. Vet.* 36: 271-276.
- Azevedo RA, Duarte ER, Geraseev LC, Coelho SG, Araújo L, Faria-Filho DE (2013) Desempenho de bezerros alimentados com silagem de leite de transição. *Pesq. Agrop. Bras.* 48: 545-552.
- Azevedo RA, Duarte ER (2013) Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. *Rev. Elet. Pesq. Ani.* 1: 84-98.
- Bayatkouhsara J, Tahmasebib AM, Naserianb AA, Mokarramc RR, Valizadeh R (2013) Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 186: 1-11.
- Biomerieux Lab Plus. *Software version 4.0.* <https://apiweb.biomerieux.com/>
- Bujnakova D, Strakova E, Kmet V (2014) In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe.* 29: 118-127.
- Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM (2008) An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60: 299-306.
- Chaves AH, Silva JFC, Pinheiro A (1999) Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. *Rev. Bras. Zootec.* 28: 1086-92.
- Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad E, Persson Y, Bengtsson B (2015) Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* 98: 500-516.
- Hirsh DC, Zee YC, Coutinho AS, Lopes CM (2003) *Microbiologia Veterinária.* Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. 446 pp.
- Machado RN, Cassoli LD, Bessi R, Pauletti P (2004) Avaliação do fornecimento adicional de colostro para bezerros. *Rev. Bras. Zootec.* 33: 420-425.
- Maldonado NC, Ruiz CS, Otero MC, Sema F, Nader-Macias ME (2012) Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. *Res. Vet. Sci.* 92: 342-349.
- Malveira DS, Guimarães F, de Araujo VV, Duarte ER, Brandi IV, Pinto MS (2016) Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros nelore criados no semiárido. *Acta Vet. Bras.* 10: 290-297.
- Mangoni J, Pozza MSS, Sabedot MA, Pozza PC, Almeida S, Heinzen EL (2011) Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína. *Acta Scient. Anim. Sci.* 33: 267-272.
- Martins ADO, Mendonça RCS, Silva DL, Ramos MS, Mauro MC, Donzele JL, Andrade NJ (2006) Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microrganismos indicadores. *Rev. Ciênc. Agrovet.* 5: 53-59.
- Meira SMM, Helfer VE, Velho RV, Medina LFC, Brandelli A (2010) Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Braz. J. Food Technol.* 3: 75-90.
- Noh DO, Gilliland SE (1993) Influence of bile on cellular integrity and b-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76: 1253-1259.
- Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3798-3806.
- Saalfeld MH (2008) Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. *A Hora Vet.* 162: 59-62.
- Saalfeld MH, Pereira DIB, Rodrigues KKS, Schramm R, Valente JSS, Borchardt JL, Gularte MA, Leite FPL (2013) Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciênc. Rural.* 43: 1636-1641.
- Salvadori MR, Valadares GF, Leite DS, Blanco J, Yano T (2003) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 34: 230-235.
- Tagg JR, MC Given AR (1971) Assay system for bacteriocins. *Appl. Microb.* 21: 943.
- Wattiaux, MA (1996) *Raising Dairy Heifers.* Wisconsin: The Babcock Institute for International Dairy Research and Development. 125 pp.