

Luciana Allegretti

Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp.,
Bifidobacterium spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e
Lactococcus spp. da microbiota intestinal de Papagaio-
verdadeiro (*Amazona aestiva*)

São Paulo
2009

Luciana Allegretti

Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp.,
Bifidobacterium spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e
Lactococcus spp. da microbiota intestinal de Papagaio-
verdadeiro (*Amazona aestiva*)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2154
FMVZ

Allegretti, Luciana

Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) / Luciana Allegretti. – São Paulo : L. Allegretti, 2009.

101 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Aves silvestres. 2. Psitacídeos. 3. *Amazona aestiva*. 4. Microbiota intestinal. 5. Bactérias ácido-láticas. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Isolamento e identificação de *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Enterococcus spp* da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)”, protocolado sob o nº1221/2007, utilizando 20 (vinte) papagaios-verdadeiros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research “Isolation and identification of *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *enterococcus spp* of the intestinal microbiota of the Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*)”, protocol number 1221/2007, utilizing 20 (twenty) parrots, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALLEGRETTI, Luciana

Título: Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu maior incentivador, ao meu grande amor, exemplo e professor. Dedico este mestrado a você, que mesmo de longe ainda inspira e rege a minha vida, dedico tudo isto a você, meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar presente em minha vida e me dar força para continuar, mesmo diante de tantas dificuldades.

À minha querida família, em especial a minha mãe e aos meus irmãos, Caê e Gustavo, por simplesmente estarem por perto, me acolherem e me deixarem os amar incondicionalmente. Agradeço-os de coração!

Ao Cazé, meu futuro marido, por toda cumplicidade, companheirismo e amor dedicado. Muito do que está aqui, meu amor, é fruto seu também. Eu o amo muito.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, por todos os ensinamentos, apoio e compreensão durante o mestrado. O agradeço também pelo convívio e amizade.

A Mariângela Allgayer pelas coletas no Criadouro Asas do Brasil e ao Renato Severi Costa por abrir as portas tão gentilmente do seu Criadouro Amazona Zootech.

Ao Projeto Papagaio-verdadeiro, em especial a Gláucia Helena F. Seixas, pelas coletas e pelo voto de confiança.

Agradeço, com todo respeito, a minha amiga Claudete S. A. Ferreira, por sempre se mostrar tão prestativa e cuidar do nosso Laboratório com tanto carinho e dedicação.

À Liliana Revolledo, pessoa de poucas palavras, porém de um coração gigante. Obrigada por toda orientação e infinitas ajudas.

Aos meus grandes amigos, Lidiane M. Martins e Jorge L. C. Villanueva, pelo maravilhoso convívio e sincera dedicação. Mesmo de longe, vocês continuam fazendo parte da minha vida, porque moram em meu coração.

Aos meus amigos, Carlos, Andyara, Marcão e André, pelas inúmeras risadas, piadas e pela grandiosa amizade demonstrada. Todos os momentos ficarão guardados, com carinho, em minha memória.

À Camila e Joelma, minhas amigas e companheiras, pela ajuda, confiança e amizade verdadeira.

Ao Maurício, pela compreensão e infundáveis tubos lavados!

À Luciana (Big Lu), Marco e Elena, pelas conversas e pelo convívio.

Agradeço em especial a minha grande amiga Marta Brito Guimarães, por todos os ensinamentos, convívio, amizade e voto de confiança. Muito do que sou hoje, eu devo a você!

Ao meu orgulho, Juliana Senhorini, pessoa dedicada, inteligente e que possui um coração maior que o próprio corpo.

À Vanessa Vertematti, por todas as coletas, viagens e amizade.

À Lívia do Ambulatório de Aves, pelo carinho e pelos milhares exames de Gram, e a minha amiga Claudia Niemeyer, pelas correções e amizade.

Agradeço a todos os estagiários, em especial ao Mateus, Cecília, Melanie, Amanda, Micaela e Filippi, por toda ajuda, paciência e excelente convívio. Obrigada de verdade, pessoal!

Ao meu amigo, Rodrigo Filippi Prazeres, por me mostrar o quão maravilhoso é o mundo das aves!

Aos amigos, Roberta Vieira, Paula Correa, Renata Costa, Priscila Sanches, Helena Isola, Juliana Naves e Guilherme Levy, por sempre estarem por perto e me incentivarem.

À UNIP pela formação acadêmica, à USP pela formação científica e à CAPES pelo suporte financeiro que viabilizou este estudo.

Agradeço de coração a todos, que direta ou indiretamente me ajudaram durante este período, e contribuíram com o meu crescimento pessoal.

RESUMO

ALLEGRETTI, L. **Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).** [Isolation and identification of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. and *Lactococcus* spp. from the intestinal microbiota of Blue-fronted Parrot (*Amazona aestiva*)]. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

No Brasil, o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é uma das aves mais procuradas como animal de estimação e comercializadas ilegalmente. Na literatura pouco é descrito sobre a microbiota intestinal de aves silvestres. O trato intestinal das aves é composto por inúmeras e diferentes espécies bacterianas. A grande maioria são bactérias gram-positivas pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas. Este estudo teve como objetivo isolar e identificar a presença de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* na microbiota entérica de papagaios *Amazona aestiva* de vida livre e de cativeiro. Para isto foram coletadas amostras de 26 aves de vida livre e de 26 aves procedentes de dois criadouros comerciais. O *Enterococcus* foi o gênero que apresentou maior frequência de isolamentos (100%), seguido dos gêneros *Pediococcus* (63,46%), *Lactobacillus* (28,84%), *Lactococcus* e *Bifidobacterium* (15,38%). Foram isoladas 12 espécies de *Enterococcus*, sendo o *E. faecium* a espécie que apresentou maior ocorrência de isolamento, presente em 63,46% das aves, seguido por *E. faecalis* isolado em 57,69% das aves, *Enterococcus* sp. identificado em 46,15% das aves, *E. hirae* em 30,76% e *E. raffinosus* em 19,23%. Seis espécies de *Pediococcus* foram isoladas, sendo que *P. pentosaceus* foi a mais freqüente e esteve presente em 57,69% das aves. Foram isoladas cinco (5) espécies de *Lactococcus*, sendo *L. lactis* subsp. *cremoris* isolados em 3,84% das aves e *Lactococcus* sp. em 9,61%. *Lactobacillus* apresentou uma maior diversidade, com 14 espécies identificadas, sendo as mais freqüentes *L. coryniformis* subsp. *torquens* e *L. sanfrancisco* com 7,69% de aves positivas para cada espécie. Três (3) espécies de *Bifidobacterium* foram isoladas, sendo *B. bifidum* identificado em 9,61%

das aves. Estudos complementares precisam ser conduzidos para uma melhor compreensão da microbiota intestinal das aves silvestres, assim como analisar as similaridades e diferenças com as aves domésticas, o que permitirá um manejo apropriado e menos empírico desta espécie em cativeiro.

Palavras-chave: Aves silvestres. Psitacídeos. *Amazona aestiva*. Microbiota intestinal. Bactérias ácido-láticas.

ABSTRACT

ALLEGRETTI, L. **Isolation and identification of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. and *Lactococcus* spp. from the intestinal microbiota of Blue-fronted Parrot (*Amazona aestiva*).** [Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)]. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In Brazil, Blue-fronted Parrot (*Amazona aestiva*) has been widely owned as a pet bird and, therefore, one of the Brazilian's birds most frequently traded illegally in the Black Market. There are few reports in the current literature regarding to the microbiota of wild birds. The gastrointestinal tract of these birds has a wide variety of bacterial species; most of them are Gram positive bacteria and belongs to the lactic acid group. The present study has isolated and identified *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, and *Lactococcus* bacterias present in fecal samples of wild and captive *Amazona aestiva* parrots. Fifty two fecal samples were collected from 26 wild parrots and 26 parrots from commercial breeders. *Enterococcus* genus was the most frequently isolated (100%), followed by *Pediococcus* (63.46%), *Lactobacillus* (28.84%), *Lactococcus* and *Bifidobacterium* (15.38%). Twelve species of *Enterococcus* were identified. *E. faecium* was the most frequently isolated from the birds representing 63.46%, followed by *E. faecalis* (57.69%), *Enterococcus* sp. (46.15%), *E. hirae* (30.76%), and *E. raffinosus* (19.23%). *P. pentosaceus* was identified from 57.69% of the parrots. This specie was the most frequently isolated. Five different species of *Lactococcus* were found out. *Lactococcus* sp. was identified from 9.61% of the birds, while *L. lactis* subsp. *lactis* represented 3.84%. Fourteen different species of *Lactobacillus* were isolated, showing the biggest diversity among all the studied genera. *L. coryniformis* subsp. *torquens* and *L. sanfrancisco* were isolated from 7.69% of the birds. Three different species of *Bifidobacterium* were isolated, and *B. bifidum* was identified in 9.61% of the birds, being the most frequently isolated. Further studies are needed to a better comprehension of the microbiota in wild birds. Besides comparing differences and similarities between

wildlife parrots and pet birds will allow appropriate and less empiric management of those birds in captivity.

Keywords: Wildlife birds. Psittacines. *Amazona aestiva*. Intestinal microbiota. Lactic acid bacteria.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação ilustrativa entre as provas bioquímicas e de PCR dos gêneros bacterianos isolados de aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro.....50
Gráfico 2 -	Comparação ilustrativa entre as provas bioquímicas e de PCR dos gêneros bacterianos isolados das aves de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zotech.53
Gráfico 3 -	Comparação ilustrativa entre as provas bioquímicas e de PCR dos gêneros bacterianos isolados das aves de cativeiro do criadouro comercial Asas do Brasil.....56
Gráfico 4 -	Gêneros bacterianos isolados de aves de vida livre e de cativeiro.....57
Gráfico 5 -	Espécies de <i>Enterococcus</i> isoladas de aves de vida livre e de cativeiro.....60
Gráfico 6 -	Espécies de <i>Pediococcus</i> identificadas de aves de vida livre e de cativeiro.63
Gráfico 7 -	Espécies de <i>Lactococcus</i> isoladas de aves de vida livre e de cativeiro.....66
Gráfico 8 -	Espécies de <i>Lactobacillus</i> isoladas de aves de vida livre e de cativeiro.....69
Gráfico 9 -	Espécies de <i>Bifidobacterium</i> isoladas de aves de vida livre e de cativeiro.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Meios de cultura, condições de incubação e gêneros bacterianos – São Paulo – 2008/200936
Tabela 2 -	Desenho dos primers para cada gênero bacteriano – São Paulo – 2008/200940
Tabela 3 -	Reação utilizada para a amplificação individual de DNA de amostras dos gêneros <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> – São Paulo – 2008/200941
Tabela 4 -	Reação utilizada para a amplificação individual de DNA de amostras do gênero <i>Lactococcus</i> – São Paulo – 2008/200941
Tabela 5 -	Condições de amplificação para as amostras de <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Pediococcus</i> spp. – São Paulo – 2008/200942
Tabela 6 -	Condições de amplificação para as amostras de <i>Lactococcus</i> spp. – São Paulo – 2008/200942
Tabela 7 -	Condições de amplificação para as amostras de <i>Lactobacillus</i> spp. – São Paulo – 2008/200942
Tabela 8 -	Condições de amplificação para as amostras de <i>Bifidobacterium</i> spp. – São Paulo – 2008/200943
Tabela 9 -	Controles positivos utilizados para cada gênero bacteriano – São Paulo – 2008/2009.....43
Tabela 10 -	Controles negativos utilizados para cada gênero bacteriano – São Paulo – 2008/2009.....44
Tabela 11 -	Resultados da identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro – São Paulo – 2008/200948
Tabela 12 -	Resultados da identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zootech– São Paulo – 2008/200952
Tabela 13 -	Resultados da Identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de cativeiro do criadouro comercial Asas do Brasil– São Paulo – 2008/200955

Tabela 14 -	Resultados da identificação de espécies de <i>Enterococcus</i> – São Paulo – 2008/2009.....	59
Tabela 15 -	Resultados da identificação de espécies de <i>Pediococcus</i> – São Paulo – 2008/2009.....	62
Tabela 16 -	Resultados da identificação de espécies de <i>Lactococcus</i> – São Paulo – 2008/2009.....	65
Tabela 17 -	Resultados da identificação de espécies de <i>Lactobacillus</i> – São Paulo – 2008/2009.....	68
Tabela 18 -	Resultados da identificação de espécies de <i>Bifidobacterium</i> – São Paulo – 2008/2009.....	71
Tabela 19 -	Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura Bifidobacterium – São Paulo – 2008/2009	99
Tabela 20 -	Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>) – São Paulo – 2008/2009	100
Tabela 21 -	Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura m-Enterococcus – São Paulo – 2008/2009	100
Tabela 22 -	Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe) – São Paulo – 2008/2009	101
Tabela 23 -	Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>) – São Paulo – 2008/2009 .	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
g	grama
HCl	ácido clorídrico
M	molar
µg	micrograma
mg	miligrama
µl	microlitro
ml	mililitro
µm	micrômetro
mM	milimolar
µM	micromolar
NaCl	cloreto de sódio
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
spp.	espécie
subsp.	subespécie
TE	tampão Tris-EDTA
U	unidade
X	vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	negativo
° C	graus Celsius
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO20
2	REVISÃO DE LITERATURA22
2.1	<i>Amazona aestiva</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E NUTRIÇÃO22
2.2	TRÁFICO ILEGAL E SUA IMPLICÂNCIA NA SAÚDE DAS AVES....23
2.3	A MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES24
2.4	BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL) E PROBIÓTICOS.....26
2.5	GÊNERO <i>Lactobacillus</i>28
2.6	GÊNERO <i>Bifidobacterium</i>29
2.7	GÊNERO <i>Enterococcus</i>30
2.8	GÊNERO <i>Lactococcus</i>31
2.9	GÊNERO <i>Pediococcus</i>32
3	MATERIAL E MÉTODOS34
3.1	ORIGEM DAS AMOSTRAS DE AVES PAPAGAIO-VERDADEIRO (<i>Amazona aestiva</i>).....34
3.2	COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS34
3.2.1	Coleta com suabes cloacais34
3.2.2	Coleta direta sem manipulação das aves35
3.3	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS35
3.3.1	Estratégia adotada para a identificação bacteriana35
3.3.2	Isolamento e identificação presuntiva dos gêneros bacterianos.....36
3.4	TÉCNICA DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE)37
3.4.1	Extração do DNA bacteriano para a PCR (Reação em cadeia pela polimerase).....37
3.4.2	Reagentes de extração.....38
3.4.3	Protocolo de extração39
3.4.4	Reação em cadeia pela Polimerase (PCR)40
3.4.5	Deteção do produto amplificado43
3.5	PROVAS BIOQUÍMICAS ESPECÍFICAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA44

4	RESULTADOS46
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS46
4.1.1	Bactérias obtidas de fezes de papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>) de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro.....46
4.1.2	Bactérias obtidas de fezes de papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>) de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zotech.....51
4.1.3	Bactérias obtidas de fezes de papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>) de cativeiro do criadouro comercial Asas do Brasil54
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS.....58
4.2.1	Análise dos resultados referentes às espécies de <i>Enterococcus</i>58
4.2.2	Análise dos resultados referentes às espécies de <i>Pediococcus</i>61
4.1.3	Análise dos resultados referentes às espécies de <i>Lactococcus</i>64
4.1.4	Análise dos resultados referentes às espécies de <i>Lactobacillus</i>67
4.1.5	Análise dos resultados referentes às espécies de <i>Bifidobacterium</i>70
5	DISCUSSÃO73
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS73
5.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS76
5.2.1	Espécies do gênero <i>Enterococcus</i>76
5.2.2	Espécies do gênero <i>Pediococcus</i>78
5.2.3	Espécies do gênero <i>Lactococcus</i>80
5.2.4	Espécies do gênero <i>Lactobacillus</i>80
5.2.5	Espécies do gênero <i>Bifidobacterium</i>82
5.2.6	Comparação entre Provas Bioquímicas e Técnicas Moleculares82
6	CONCLUSÕES85
	REFERÊNCIAS86
	APÊNDICE A.....99

1 INTRODUÇÃO

Os papagaios pertencem à classe *Reptilia*, subclasse *aves*, ordem *Psittaciformes*, família *Psittacidae* e gênero *Amazona*. Dentro deste gênero destaca-se o papagaio *A. aestiva* também chamado popularmente de papagaio-verdadeiro. Esta é uma das aves brasileiras mais procuradas por apresentar caráter sociável e capacidade de vocalização de diferentes sons, inclusive a voz humana. Segundo Sick (1997) o mesmo caracteriza-se por não possuir dimorfismo sexual externo, pesar em torno de 400g, apresentar o bico curvo e negro, papo grande, tarso curto, pés zigodáctilos (o quarto dedo é deslocado para trás junto ao primeiro), mostrando uma grande habilidade nos dedos.

O interesse das pessoas por estas aves, como animais de estimação é grande e resulta conseqüentemente em um aumento de criadores comerciais cadastrados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) para a comercialização de aves legalizadas, saudáveis e domesticadas. Porém os preços elevados, cerca de seis a dez vezes maiores dos criadouros comerciais fazem com que haja procura através do mercado ilegal (LARA, 2006). O tráfico desta espécie de psitacídeo é abundante, estima-se que cerca de 90% dos animais traficados morram antes de chegarem aos destinos finais devido às condições inadequadas de captura e manutenção (RIBEIRO; SILVA, 2007). Como conseqüência deste enorme estresse de manipulação sobre as aves, é comum apresentarem enterites bacterianas, sendo o desequilíbrio da homeostasia do microambiente gastrointestinal, imunodepressão e alteração da resposta imune os principais problemas.

A presença destes fatores, e da alta freqüência de afecções gastrointestinais nestas aves, despertou a preocupação com a saúde intestinal destes animais e o interesse em conhecer a microbiota intestinal, em vista da escassez de pesquisas realizadas nesta área.

O trato intestinal das aves é composto por diferentes espécies bacterianas, dentre elas, a grande maioria são bactérias gram-positivas, como exemplo se podem citar os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*. Acredita-se que elas promovam efeitos benéficos na microbiota

intestinal dos animais, como a inibição da colonização e invasão do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas, estimulação do sistema imune local, e o auxílio da digestão e absorção de nutrientes e de vitaminas essenciais. Essas características permitem que estas bactérias individualmente ou em conjunto possam ser classificadas como probióticas. Este termo define microrganismos vivos capazes de beneficiar a saúde do hospedeiro, pelos mecanismos anteriormente mencionados, e restaurar o equilíbrio intestinal. Os mesmos vêm sendo muito pesquisados em frangos de corte nos últimos anos, devido à facilidade de obtenção de material biológico, apresentando resultados extremamente promissores. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e comparar a microbiota intestinal de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de cativeiro e de vida livre, por provas bioquímicas e moleculares (Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR) os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Amazona aestiva*: CARACTERÍSTICAS GERAIS, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E NUTRIÇÃO

A maioria dos papagaios brasileiros pertence ao gênero *Amazona* (LARA, 2006). No Brasil treze espécies são conhecidas, sendo elas: Cavacué (*Amazona autumnalis*), Papagaio-da-Serra ou Charão (*Amazona pretrei*), Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), Chauá (*Amazona rhodocorytha*), Papagaio-de-Bochecha-azul (*Amazona dufresniana*), Papa-cacau (*Amazona festiva*), Papagaio-Galego (*Amazona xanthops*), Papagaio-Campeiro (*Amazona ochrocephala*), Papagaio-do-mangue (*Amazona amazonica*), Papagaio-moleiro (*Amazona farinosa*), Papagaio-dos-Garbes (*Amazona kawalli*), Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) e Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (SICK, 1997).

A espécie *Amazona aestiva* é a mais procurada da família por conseguir imitar grande variedade de sons humanos, ser sociável e facilmente encontrada (LARA, 2006). Sua plumagem geral é verde, a fronte e o loro são azuis e o amarelo da cabeça estende-se por cima e por detrás dos olhos contornando-os. O espelho e as bases das retrizes são escarlates e a dobra da asa vermelha. A cor da íris dos adultos é laranja enquanto dos jovens marrom (SICK, 1997).

De acordo com Forshaw e Cooper (1989) esta espécie tem distribuição relativamente ampla, podendo ser encontrada desde o noroeste do Brasil, até o Piauí, sul do Rio Grande do Sul e sudeste do Mato Grosso (incluindo a região centro-oeste), embora em algumas áreas o desmatamento tenha afetado o seu *status* populacional.

A dieta destes animais na natureza é variada. Foi descrito que eles consomem grande variedade de alimentos, incluindo frutas, bagas, flores, brotos de plantas, legumes, insetos, larvas e sementes (ULLREY et al., 1991). A literatura sobre a nutrição de psitacídeos é muito escassa, a maioria das publicações são observações de hábitos alimentares, razão pela qual, as dietas comerciais são formuladas com critérios muito mais empíricos do que científicos (KAMWA, 2002;

LARA, 2006). As recomendações de exigências nutricionais para as aves de gaiolas foram embasadas na extrapolação do *National Research Council* (NRC) para as aves de produção e em pesquisas e experiências práticas dos integrantes do comitê da *Association of American Feed Control Officials* (AAFCO). Devido ao mínimo de informações nutricionais para aves, o comitê da AAFCO optou pelo desenvolvimento de uma só recomendação de crescimento e manutenção para cada ordem (*psitaciformes* e *passeriformes*), independentemente das várias espécies que nela se incluam. Dessa forma, um perfil nutricional para a manutenção geral de todos os psitacídeos foi desenvolvido, independente do tamanho ou gênero (AAFCO, 1998).

É importante ressaltar que as bactérias intestinais dos animais estão diretamente relacionadas com a dieta (MOROTOMI, 1997). A microbiota intestinal é formada a partir da colonização de diferentes comunidades microbianas benéficas no trato intestinal as quais exercem um papel indispensável na manutenção de seu equilíbrio (WALTER et al., 2001). Tem sido demonstrado que os nutrientes da dieta exercem um papel fundamental não só na nutrição das aves, como também na estimulação de algumas populações microbianas predominantes (LAN et al., 2005). As aves subnutridas têm a capacidade imunológica reduzida e são mais suscetíveis a infecções e doenças sistêmicas do que aquelas bem nutridas (CARCIOFI, 2001). Pla (2006) afirma que a má nutrição freqüentemente é a causa direta de muitas doenças em aves. Sabe-se que a dieta e os suplementos nutricionais induzem mudanças temporais no metabolismo do hospedeiro e na função das células do sistema imune durante os diferentes estágios da resposta. Conhecendo esses dados seria possível formular dietas que permitiriam otimizar a resistência aos agentes patogênicos mais comuns (KOGUT; KLANSING, 2009). Mas neste aspecto, na nutrição das aves silvestres muito pouco é conhecido, especialmente relacionado às necessidades específicas de nutrientes para os psitacídeos (KLANSING, 2009).

2.2 TRÁFICO ILEGAL E SUA IMPLICÂNCIA NA SAÚDE DAS AVES

As principais ameaças para estas aves são a perda, a fragmentação de seu habitat e o tráfico ilegal. Somente no estado do Mato Grosso do Sul durante treze

anos foi a espécie mais encontrada nas apreensões efetuadas pelas autoridades competentes. Apesar do papagaio-verdadeiro não estar ameaçado de extinção, desde 1981 foi incluído no apêndice II da Convenção Internacional para o Comércio da Fauna e Flora (CITES), como uma espécie que necessita de ações que regulamentem seu comércio e evitem a retirada indiscriminada dos papagaios da natureza (SEIXAS; MOURÃO, 2002). O tráfico de animais silvestres e de seus produtos é a terceira atividade ilícita mais rentável do planeta. No Brasil, cerca de trinta e oito milhões de espécimes são retiradas anualmente de seus ambientes naturais (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres – RENCTAS, 2002). Estima-se que no comércio de animais vivos cerca de 90% morram e para cada produto animal comercializado sejam mortos pelo menos três espécimes. Esse índice de mortalidade é alto durante todo o processo de captura e comercialização devido ao estresse, maus-tratos e principalmente condições sanitárias precárias, de transporte e de alimentação (REDFORD, 1992; TOUFEXIS, 1993; RIBEIRO; SILVA, 2007). O estresse social e ambiental afeta o sistema imunológico e aumenta a susceptibilidade a doenças (KOUTSUS; KLASING, 2008). Assim como, o estresse psicológico parece ser capaz de alterar a susceptibilidade dos animais em relação aos agentes infecciosos, influenciando o surgimento, a evolução e a resolução de certas doenças (BIONDI; ZANNINO, 1997). A maioria dos fatores ambientais que causam imunossupressão em aves está relacionada a problemas de manejo tais como suprimento inadequado de água e comida, estresse térmico, interações sociais e presença de micotoxinas no alimento (CHAT; SKINNER, 2008). As condições sanitárias podem influenciar a colonização intestinal por bactérias patogênicas em psitacídeos (STYLES; FLAMMER, 1991). O desequilíbrio desta microbiota com conseqüente proliferação de bactérias patogênicas pode resultar em infecção intestinal severa levando a ave a óbito (GEDEK, 1986).

2.3 A MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES

No planeta existe uma enorme diversidade de espécies de aves e as mesmas preenchem variados nichos da cadeia alimentar. O conteúdo nutricional e os

atributos físicos dos alimentos disponíveis no meio ambiente foram responsáveis, durante a evolução, pela morfogênese do trato gastrointestinal, estratégia digestiva e capacidade metabólica. Seu trato gastrointestinal abriga um grande número de microorganismos e a sua anatomia irá variar de acordo com a dieta (KLASING, 1999).

Shapiro e Sarles (1949) relataram a presença de bactérias comensais no intestino delgado de aves de um dia de idade. As bactérias que colonizam o trato intestinal precocemente tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a microbiota intestinal. A formação da microbiota intestinal das aves se dá imediatamente após o nascimento e aumenta durante as primeiras semanas de vida (FIORMONTI; THRODORU; BUENO, 2003). Estima-se que haja entre 10^9 a 10^{14} bactérias/ g de fezes no intestino dos animais (FULLER, 1989). Geralmente os gêneros de bactérias no intestino delgado de aves saudáveis são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Clostridium*, sendo que essa microbiota aumenta em densidade e diversidade nas regiões distais do intestino. É necessário ressaltar que o estabelecimento de uma microbiota estável é um processo complexo influenciado por muitos fatores que incluem a idade do animal, a dieta, o uso de antibacterianos e probióticos (PATTERSON; BULKHOLDER, 2003; GONG et al., 2008).

A microbiota saudável definida como normal é aquela que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Acredita-se que 99% da microbiota sejam compostas por bactérias facultativas, ou seja, aeróbicas e anaeróbicas, e produtoras de ácido láctico, incluindo bactérias exclusivamente anaeróbicas como *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteróides*, *Fusobacterium* e *Eubacterium*. O restante desta flora (1%) é constituído de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, entre outras (SAVAGE, 1977). Segundo Rupley (1999) a flora normal da cloaca das aves é predominantemente gram-positiva e isso inclui *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* não β -hemolítico e *Staphylococcus* (excluindo *S. aureus*). Os microorganismos gram-negativos identificados foram *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Flavobacterium odoratum*, *Erwineae carotovora*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter caecoaceticus* e

Citrobacter freundii. Em geral o isolamento de *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Staphylococcus aureus* hemolítico, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Mycobacterium* é clinicamente importante em aves doentes (MORRISEY, 1997; RUPLEY, 1999).

O desbalanceamento da microbiota com conseqüente proliferação de microorganismos indesejáveis pode causar diarreia, infecções, perda de peso, anorexia, má-digestão e melena (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; MORRISEY, 1999). A alteração da população de microorganismos da microbiota intestinal é chamada de disbiose e ocorre em condições diversas como jejum alimentar ou hídrico prolongado, estresse, manejo inadequado, variações de temperatura, deficiências na dieta (por ex. de vitamina A), agentes infecciosos, fatores genéticos, alérgicos, imunossupressão e infecções virais (ROSSKOPF; WOERPEL, 1996; GARLICH, 1999). Em situações de disbiose, a população microbiana indesejável atua no trato gastrointestinal diminuindo a absorção de nutrientes, aumentando a espessura da mucosa, alterando a renovação dos enterócitos e a velocidade de passagem do alimento (GARLICH, 1999).

No entanto, há bactérias que promovem ações benéficas para o organismo. Acredita-se que elas sejam responsáveis por prevenir diarreias, infecções intestinais e diminuir a constipação, por meio da combinação de alguns mecanismos, como a produção de antimicrobianos contra bactérias intestinais patogênicas, imunoestimulação, síntese de vitaminas e melhor digestão e absorção de nutrientes essenciais (FIORAMONT; THRODORU; BUENO, 2003; KWON et al., 2005).

2.4 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL) E PROBIÓTICOS

O termo bactéria comensal tem sido utilizado para referir-se à microbiota normal residente do hospedeiro, no entanto os probióticos são atualmente definidos como suplementos alimentares contendo bactérias benéficas que atuam no hospedeiro. Os lactobacilos, bifidobactérias, lactococos, enterococos e outras bactérias denominadas ácido-láticas (BAL) são os microrganismos que constituem a

microbiota residente no intestino do homem e dos animais, sendo as bactérias mais utilizadas como probióticos (BRISBIN et al., 2008).

As BAL estão intimamente associadas com bactérias responsáveis pela fermentação de alimentos (SALMINEN et al., 2004) e são constituídas por vários grupos bacterianos dentro do Filo *Firmicutes* que compreendem cerca de 20 gêneros, dos quais os mais comuns são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998; ROLFE, 2000; REDDY et al., 2008). Apesar de pertencer a outro grupo filogenético, o gênero *Bifidobacterium* está incluído devido a sua atividade probiótica, (VANDAMME et al., 1996). As BAL são gram-positivas, geralmente catalase negativa, não produtoras de esporos (exceto *Bacillus* e *Sporolactobacillus*), produzem ácido lático como produto final da fermentação de carboidratos, crescem em condições de microaerofilia, anaerobiose, e possuem propriedades fisiológicas e bioquímicas semelhantes (KLEIN et al., 1998; SALMINEN et al., 2004). São heterotróficos e geralmente têm exigências nutricionais complexas (ex. múltiplos aminoácidos e vitaminas) por serem deficientes em muitas vias metabólicas. Portanto, as BAL são abundantes somente em microambientes onde estes componentes estão disponíveis (REDDY et al., 2008). Quanto à morfologia, podem ser divididas em bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros). Uma exceção foi descrita, o gênero *Weissella*, o qual pode incluir tanto cocos quanto bastonetes (COLLINS et al., 1993). O crescimento em temperaturas diferentes e a tolerância a diferentes concentrações de sais contribui para se distinguir alguns gêneros cocóides, por exemplo, os *Enterococcus* que crescem a 10°C, 45°C e NaCl 6.5%, dos *Lactococcus* e *Vagococcus* que crescem a 10°C, mas não a 45°C e variavelmente em NaCl 6.5%, e dos *Streptococcus*, que por sua vez, geralmente não crescem a 10°C, crescem variavelmente dependendo da espécie a 45°C e em NaCl 6.5% (MUNDT, 1986; SALMINEN et al., 2004). Historicamente *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* pertenciam ao mesmo grupo, porém eles foram separados após revisões taxonômicas. A classificação exata dos gêneros das BAL através de séries bioquímicas tem se tornado cada vez mais difícil devido a grande descrição de novos gêneros e espécies (SALMINEN et al., 2004). As mesmas têm sido relatadas

por diversos estudos (MITSUOKA, 1990; PERDIGON et al., 1995; SALMINEN; WRIGHT, 1998), pois além de fazerem parte da microbiota intestinal normal de diferentes animais também agem como probióticos (MITSUOKA, 1990; PERDIGON et al., 1995). A preparação de um probiótico deve conter diversas espécies bacterianas, sendo as mais comuns as do grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) (KLEIN et al., 1998; ROLFE, 2000). Dentre as espécies mais encontradas estão *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus agilitis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus* I 26, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Saccharomyces boulardii* e *Enterococcus faecium* (SANTOS; TURNES, 2005). Nava et al. (2005) afirmaram que os probióticos devem ser administrados às aves o mais precocemente possível, a fim de que as bactérias presentes no produto, colonizem e se multipliquem no trato intestinal do hospedeiro, iniciando suas atividades benéficas antes deste ser contaminado por algum patógeno. Rolfe (1991) descreve pelo menos quatro mecanismos envolvidos no desenvolvimento de um micro-ambiente favorecendo aos microorganismos benéficos: a criação de uma micro-ecologia que seja hostil a outras bactérias, a eliminação de receptores específicos a bactérias patogênicas, a produção e secreção de metabólitos antimicrobianos (bacteriocinas) e a competição por nutrientes essenciais com as bactérias indesejáveis.

Desde o início do século passado é conhecido o efeito benéfico dos microorganismos sobre a integridade da mucosa do tubo digestivo. No entanto, apenas em 1965 os pesquisadores Lilly e Stillwell utilizaram pela primeira vez o termo probiótico, verificando a ação de microorganismos como promotores de crescimento e somente na década de 70, os probióticos começaram a ser utilizados em animais incentivados pelo uso indiscriminado de antibióticos.

2.5 GÊNERO *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é um bacilo ou cocobacilo gram-positivo que faz parte da microbiota do trato gastrointestinal tanto de animais quanto de humanos. São amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em diversos produtos alimentícios devido ao seu potencial probiótico. Não são móveis em sua

grande maioria, catalase e oxidase negativas, não reduzem nitrato, não produzem indol ou H₂S e nem formam esporos (KONEMAN et al., 2005).

O gênero contém cento e sessenta (160) espécies e vinte e sete (27) sub-espécies (EUZÉBY, [2009?a]) classificadas em três grandes grupos: *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios, que fermentam hexoses em ácido láctico; *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos, que fermentam hexoses em ácido láctico somente ou ácido láctico junto com ácido acético, etanol e ácido fórmico sob limitação de glicose; e os *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios, que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, e pentoses em ácido láctico e ácido acético (POT et al., 1994). As espécies mais encontradas no Inglúvio e no intestino delgado das aves são *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum* e *L. reuteri*, enquanto *L. acidophilus* é encontrado no Inglúvio, cloaca, duodeno, jejuno e cecos (ANDREATTI FILHO; SAMPAIO, 1999). Algumas espécies de *Lactobacillus* são utilizadas como probióticos, como exemplo podemos citar *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* e *L. fermentum* (REID, 1999).

Jin et al. (1998a), Jin et al. (1998b) e Kalavathy et al. (2003) relataram que bactérias do gênero *Lactobacillus*, adicionadas à ração, aumentaram o ganho de peso e melhoraram a conversão alimentar dos animais suplementados.

2.6 GÊNERO *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* pode apresentar morfologias que incluem bacilos curtos e curvados, bacilos com forma de bastonetes bifurcados. Fazem parte da microbiota intestinal de humanos e animais. É estritamente anaeróbico, imóvel, catalase negativa, não formador de esporo e desprovido de flagelos. São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato (CROCIANI et al., 1994). O gênero inclui trinta e sete (37) espécies e 9 sub-espécies (EUZÉBY, [2009?b]), 10 das quais de origem humana, 17 de origem animal, duas (2) de águas residuais e uma de leite fermentado (SGORBATI et al., 1995; GOMES; MALCATA, 1999). Sua identificação

está relacionada com a detecção de sua única enzima envolvida, a frutose-6-fosfato fosfoquetolase, a qual pode ser usada como marcador taxonômico (MULLIÉ et al., 2003). Recentemente têm-se estudado cepas de *Bifidobacterium* que possam apresentar potenciais probióticos para humanos e produtos alimentares (KWON et al., 2005). Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (LEE et al., 1999; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

Tem se discutido os efeitos benéficos das bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* por décadas. Os mesmos resistem aos ácidos gástricos, sais biliares, enzimas pancreáticas, possuem a capacidade de se aderirem à mucosa intestinal, colonizando-a rapidamente. Estão também diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon, entre outros. Porém, o verdadeiro mecanismo, pelo qual essas bactérias estimulam o sistema imune ainda permanece com muitos pontos a serem esclarecidos (FULLER; GIBSON, 1997; ROLFE, 2000). O íleo terminal e o cólon parecem ser respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dessas bactérias (CHARTERIS et al., 1998; BIELECKA et al., 2002). Mas deve-se salientar que o efeito de uma bactéria do mesmo gênero é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive para outros isolados da mesma espécie (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

2.7 GÊNERO *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* spp. apresenta-se como células gram-positivas esféricas ou ovóides, 0,6 – 2,0 X 0,6 – 2,5µm, ocorrem em pares ou cadeias curtas em meio líquido. Podem ser encontradas no trato intestinal de animais e humanos. São anaeróbios facultativos, móveis, possuem flagelos reduzidos e ausência de cápsula. Crescem geralmente a 10°C e 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C, em pH 9,6 com 6,5% de NaCl e na presença de sais biliares a 40% (meio bile esculina) (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Por um longo tempo foram classificados como *Streptococcus*, estes se destacavam por apresentar alta

resistência a agentes físicos e químicos. Pertenciam ao grupo sorológico D *streptococci*. Nas últimas décadas, devido a mudanças taxonômicas, o gênero *Enterococcus* foi separado do gênero *Streptococcus* (TEIXEIRA et al., 2007). Quarenta espécies foram propostas para serem incluídas neste gênero (EUZÉBY, [2008?a]). Contrariamente a outras BAL, os *Enterococcus* não são considerados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, bactérias reconhecidas como seguras e sua detecção na água é um indicador de contaminação fecal (GODFREE et al., 1997) São patógenos oportunistas reconhecidos por causarem bacteremias e infecções hospitalares em humanos e atualmente considerados como agentes patogênicos emergentes (MOELLERING JR., 1992). Apresentam resistência a agentes antimicrobianos, como a ampicilina, aminoglicosídeos, vancomicina e teicoplanina (BONTEN et al., 2001; RICE et al., 2003). As espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são intrinsecamente resistentes a baixos níveis de vancomicina (VanC) e algumas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* podem adquirir resistência a vancomicina (VanB) (NAVARRO; COURVALIN, 1994). *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* são as espécies mais isoladas, e em 80 a 90% dos casos de infecção por *Enterococcus* em humanos as mesmas estão envolvidas. As espécies de *Enterococcus* que apresentam maior destaque como probióticos são: *E. faecium* e *E. faecalis* (HOLZAPFEL et al., 2001), estes são comercializados em alguns países no tratamento de diarreias em humanos (TAMIME, 2002), no entanto em outros, como no Canadá, este grupo de bactérias foram banidas como probióticos (OGIER; SERROR, 2008).

2.8 GÊNERO *Lactococcus*

O gênero *Lactococcus* apresenta-se como células gram-positivas esféricas ou ovóides de 0,5 – 1,2 X 0,5 – 1,5µm, ocorrem em pares ou pequenas cadeias em meio líquido. Estão amplamente distribuídos no meio ambiente, são habitantes inócuos de alimentos, principalmente laticínios. São anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativa, não formam endósporos e crescem geralmente a 10°C, mas não a 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento a 30°C (HOLT et al., 1994;

RUOFF, 1994; COURVALIN et al., 1998;). O gênero inclui seis (6) espécies (EUZÉBY, [2008?b]), sendo o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o mais encontrado em produtos lácteos (CASALTA; MONTEL, 2008). Comumente não são considerados patógenos significativos de humanos e animais, pois são pouco isolados clinicamente, sendo mais associados a infecções oportunistas (RUOFF, 1994; COURVALIN et al., 1998). Porém já foi relatado *L. garviae* como agente causador de infecção em peixes, especialmente em criações intensivas da aquicultura moderna, de mastite de gado leiteiro e de alguns casos humanos em pacientes imunossuprimidos (CASALTA; MONTEL, 2008). Antigamente, eram classificados como *Streptococcus* ou *Lactobacillus* (SCHLEIFER et al., 1985), podem ser facilmente confundidos com outras bactérias gram-positivas, por exemplo, com *Enterococcus* (DEASY et al., 2000; TEIXEIRA et al., 1996). Métodos moleculares têm ajudado na diferenciação de algumas espécies de *Lactococcus* (ELLIOT; FACKLAM, 1996; TEIXEIRA et al., 1996). O *Lactococcus* que apresenta maior destaque como probiótico é o *L. lactis* (HOLZAPFEL et al., 2001).

2.9 GÊNERO *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* é composto por bactérias gram-positivas, apresentam-se em forma de cocos, nunca alongadas, variam entre 1,0-2,0µm de diâmetro, agrupam-se em pares e tétrades. Podem ser encontrados em produtos alimentícios e vegetais em fermentação. São anaeróbios facultativos, podendo crescer em condições de microaerofilia, catalase negativa, não são móveis e não formam esporos. Seu crescimento é dependente da presença de carboidrato fermentável. A temperatura ótima de crescimento varia de 25°C a 40°C (HOLT et al.; 1994). Produz ácido-lático a partir exclusivamente da fermentação da glicose. Quinze espécies foram propostas para serem incluídas neste gênero (EUZÉBY, [2009?c]). A espécie *Pediococcus urinaeequi* foi recentemente reclassificada como *Aerococcus urinaeequi* (FELIS et al., 2005). Não são patogênicos para plantas e animais. Análises filogenéticas baseadas no seqüenciamento da região 16S rRNA tem indicado a presença de espécies de *Pediococcus* ainda não descritas.

Pesquisadores relataram a presença de duas amostras em vinhos chineses com características fenotípicas de *Pediococcus*, porém diferentes de todas as espécies conhecidas (ZHANG et al., 2005). A espécie de *Pediococcus* mais encontrada em probióticos é *P. acidilactici* (HOLZAPFEL et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS DE AVES PAPAGAIO-VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)

Foi coletado material de três locais:

- a) Vinte aves (20) de vida livre e seis (6) do centro de reabilitação de animais silvestres (CRAS) provenientes da região do Pantanal do Mato Grosso do Sul com o auxílio do Projeto Papagaio-verdadeiro, supervisionado e coordenado pela Dra. Gláucia Helena Fernandes Seixas.
- b) Dezesete (17) aves provenientes do criadouro comercial Amazona Zotech, localizado no município de Caucaia do Alto no Estado de São Paulo, registrado no IBAMA sob o número 207282, e;
- c) Nove (9) aves do criadouro comercial Asas do Brasil, localizado em Novo Hamburgo - RS, registrado no IBAMA sob o número 97371.

As aves obtidas apresentavam-se aparentemente híidas e saudáveis no momento da coleta. Possuíam idades variadas, porém as de vida livre eram predominantemente filhotes ainda presentes no ninho.

3.2 COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

3.2.1 Coleta com suabes cloacais

As fezes das aves do Projeto Papagaio-verdadeiro e do criadouro comercial Asas do Brasil foram coletadas diretamente da cloaca com a utilização de suabe contendo meio de transporte AMIES (carvão ativado).

3.2.2 Coleta direta sem manipulação das aves

As fezes das aves do criadouro comercial Amazona Zotech foram obtidas sem que houvesse manipulação dos animais para não estressá-los. As amostras foram coletadas após sua recente eliminação, através da utilização de um pedaço de papel alumínio esterilizado colocado no fundo das gaiolas. Estes papéis alumínio com fezes frescas foram cuidadosamente dobrados, a fim de que as fezes não ficassem expostas ao meio ambiente.

Após a coleta, os materiais foram transportados dentro de uma caixa térmica com gelo, para manter uma temperatura de refrigeração entre 2 e 8°C, até o Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), para o processamento, isolamento e identificação bacteriana.

3.3 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

3.3.1 Estratégia adotada para a identificação bacteriana

Adotou-se a estratégia de isolamento e identificação das bactérias, respeitando a seguinte ordem:

- 1) Isolamento e identificação presuntiva dos gêneros bacterianos através de provas bioquímicas;
- 2) Confirmação dos gêneros bacterianos por provas moleculares (PCR);
- 3) Identificação, somente dos gêneros que foram positivos na PCR, das espécies bacterianas através de provas bioquímicas específicas.

3.3.2 Isolamento e identificação presuntiva dos gêneros bacterianos

As amostras foram individualmente semeadas em meios líquidos para promover a multiplicação bacteriana, respeitando a proporção de um grama de fezes para cinco mililitros de meio de cultura (ATLAS; PARKS, 1997). Os meios de cultura utilizados (vide Apêndice A), as condições de incubação e os gêneros bacterianos estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Meios de cultura, condições de incubação e gêneros bacterianos – São Paulo – 2008/2009

Meios de cultura	Condições de incubação	Gêneros bacterianos
Caldo MRS	37° C por 24-48horas	<i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp.
Caldo Bifidobacterium	37° C por 48-72horas	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Caldo TSB	37° C por 24-48horas	<i>Enterococcus</i> spp.
Caldo BHI	37° C por 24-48horas	Outras espécies de interesse

Como mostra a tabela 1 o caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe, Difco®) foi utilizado com o intuito de isolar *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Pediococcus* spp., o caldo Bifidobacterium para o isolamento de *Bifidobacterium* spp., caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*, Difco®) para *Enterococcus* spp e o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco®) para outras possíveis bactérias de interesse.

Os caldos MRS, TSB e BHI semeados com as amostras fecais foram incubados por 24 a 48 horas a 37°C. Após este período, foram repicados em placas de Ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe, Difco®), Ágar m- *Enterococcus* (Difco®) e Ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco®), respectivamente, incubando-as por 24 a 48 horas a 37°C.

O caldo Bifidobacterium com conteúdo fecal foi incubado a 37°C por 48 a 72 horas em anaerobiose utilizando uma jarra de anaerobiose (Probac do Brasil®) com o gerador de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil®). Posteriormente, no caso do isolamento de *Bifidobacterium* spp. foi utilizado o meio seletivo Ágar Bifidobacterium (Difco®) em condições de anaerobiose, colocando-o na jarra de

anaerobiose (Probac do Brasil®) como gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac do Brasil®), incubando-o nas condições acima descritas (ATLAS; PARKS, 1997).

Para todos os casos, as colônias foram isoladas para a obtenção de culturas puras. Uma vez isoladas em culturas puras, observou-se macroscopicamente a coloração e a morfologia de cada colônia. Provas presuntivas para os gêneros de interesse foram realizadas, como a prova da catalase e a coloração de Gram, esta última para verificar microscopicamente a morfologia bacteriana. A partir destes dados, foram selecionadas as colônias que tinham as seguintes características:

- a) prova da catalase negativa,
- b) gram-positivas,
- c) morfologia de cocos, cocobacilos e bacilos não-esporulados

Uma vez definidas estas características, as bactérias selecionadas e que passaram esta primeira fase foram encaminhadas para a realização de provas bioquímicas para se identificar o gênero bacteriano. As provas bioquímicas se basearam em crescimento a 10°C, 45°C, NaCl 6.5% e na utilização de bile esculina 40% (SALMINEN et al., 2004), com exceção do *Bifidobacterium* spp., pois não há descrições na literatura destas provas para este gênero. Nos casos em que as características indicavam que poderia tratar-se de uma colônia do gênero *Bifidobacterium*, ou seja, bacilos gram-positivos não-esporulados, era realizado diretamente o procedimento de extração do DNA bacteriano e posteriormente PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase). Para as demais colônias identificadas e que apresentavam perfil bioquímico dos gêneros de bactérias ácido - lácticas, realizou-se também o procedimento de extração do DNA bacteriano e a confirmação pela técnica da PCR.

3.4 TÉCNICA DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE)

3.4.1 Extração do DNA bacteriano para a PCR (Reação em cadeia pela polimerase)

O protocolo de extração de DNA bacteriano foi realizado segundo a metodologia descrita por Boom et al. (1990). As colônias previamente selecionadas

para cada um dos gêneros bacterianos estudados foram cultivadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco®) a 37° C por 24 horas, esta foi utilizada como a suspensão bacteriana inicial para a extração do DNA bacteriano.

3.4.2 Reagentes de extração

Os reagentes utilizados neste método de extração foram os seguintes:

Tampão de Lise:

- Isotiocianato de guanidina – 120 g
- Triton X-100 – 1ml
- EDTA 0.5 M (pH 8.0) – 8,8 ml
- Tris-HCl 0.1 M (pH 6.4) – 111.2 ml

Tampão de Lavagem:

- Isotiocianato de guanidina – 120 g
- Tris-HCl 0.1 M (pH 6.4) – 100 ml

Solução Carreadora:

- Sílica – 1g
- Água destilada – 5 ml
- HCl 37% - 50 µl

Tampão de Eluição:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).
- 1 mM EDTA.

3.4.3 Protocolo de extração

Ao microtubo que continha 200µl da suspensão bacteriana foi adicionado 1ml do tampão de lise (120 gr de Isotiocianato de Guanidina, 1ml de Triton 100X, 111,2ml de Tris-HCl 0,1 M – pH 6,4 – 8,8 ml de EDTA 0,5M) e 40µl de suspensão carreadora (1g sílica, 50µl de HCl e 5ml de água ultrapura).

O microtubo contendo a suspensão da amostra foi agitado por 1 minuto e mantido em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida o microtubo foi centrifugado por 2 minutos a 12800 rpm, com o rotor Ch. 006021 (Heraeus, Sorvall®, USA). O sobrenadante obtido foi descartado e ao *pellet* formado adicionado 1ml do tampão de lavagem (120 gr de Isotiocianato de Guanidina, 100ml de Tris-HCl 0,1 M – pH 6,4). O microtubo foi agitado por 15 segundos e centrifugado 2 minutos a 12800 rpm, com o rotor Ch. 006021 (Heraeus, Sorvall®, USA).

O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento (*pellet*) novamente submetido a este procedimento. O *pellet* obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona. Os microtubos contendo o *pellet* tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37°C por 30 minutos. Após a completa secagem do *pellet* foi adicionado 150µl de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM – pH 8,0, EDTA 1mM – pH 8,0) ao microtubo e este foi agitado por 1 minuto e mantido a 56°C por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 12800 rpm, com o rotor Ch. 006021 (Heraeus, Sorvall®, USA) e o sobrenadante contendo o DNA foram mantidos a menos 20°C até sua utilização na PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase). Em todas as análises foram utilizados controles positivos e negativos.

Em seqüência ao procedimento de extração do DNA bacteriano realizaram-se provas da PCR.

3.4.4 Reação em cadeia pela Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA extraído foi realizada em separado para cada uma das bactérias a fim de se determinar o limiar de detecção para cada uma das reações e a melhor temperatura de hibridização (BABADOPULOS, 2001).

Os *primers* e as reações para a amplificação individual de DNA de cada gênero bacteriano estão descrito nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Desenho dos primers para cada gênero bacteriano – São Paulo – 2008/2009

Gêneros Bacterianos	Primers	Sequências 5' - 3'	Pares de Base (pb)	Referências
<i>Lactobacillus</i> spp.	Primer A	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	250	DUBERNET et al., 2002
	Primer B	CTTGACACACCGCCCGTCA		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Primer A	GGGTGGTAATGCCGGATG	530	KOK et al., 1996
	Primer B	CAACCGTTACACCGGGAA		
<i>Enterococcus</i> spp. ¹	Primer A	AAGCAACGCGAAGAACCTTA	194	Desenhado neste estudo
	Primer B	GTCTCGCTAGAGTGCCCAAC		
<i>Lactococcus</i> spp. ²	Primer A	GAGCGCAACCCCTATTGTTA	339	Desenhado neste estudo
	Primer B	CTCACCGGCTTTGGGTATTA		
<i>Pediococcus</i> spp. ³	Primer A	GCTATCACTTCTGGATGGACC	405	Desenhado neste estudo
	Primer B	GCCGAAGGCTTTCACATTAG		

Fonte: 1. *Primer3 Output* (www.primer3_results.cgi), obtido a partir dos seguintes consensus: Genbank GQ 202631, GQ 179699, GQ 131194; 2. *Primer-BLAST primer designing tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>), obtido a partir dos seguintes consensus: Genbank AY 762111.1, AY 762109.1, AY 762107.1, AY 762105.1, AM 944737.1, EF 204373.1, EF 204371.1, EF 204371.1, EF 204369.1, EF 204369.1; 3. *Primer-BLAST primer designing tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>), obtido a partir dos seguintes consensus: GQ 240304.1, FJ 892738.1, FJ 892737.1, FJ 538567.1, FM 878598.1, EU 648133.1, EU 648129.1, EU 648119.1, EU 648118.1, EU 648117.1.

Tabela 3 - Reação utilizada para a amplificação individual de DNA de amostras dos gêneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* – São Paulo – 2008/2009

Reagente	Volume
Água ultrapura	14,4 µl
Tampão de PCR	2,5 µl
MgCl ₂	0,75 µl
dNTP mix	4,0 µl
<i>Primer A</i> (senso)	1,25 µl
<i>Primer B</i> (anti-senso)	1,25 µl
Taq DNA polimerase	0,1 µl
DNA (amostra)	0,75 µl
Volume final	25 µl

Fonte: BABADOPULOS, 2001.

Tabela 4 - Reação utilizada para a amplificação individual de DNA de amostras do gênero *Lactococcus* – São Paulo – 2008/2009

Reagente	Volume
Água ultrapura	14,05 µl
Tampão de PCR	2,5 µl
MgCl ₂	0,75 µl
dNTP mix	4,0 µl
<i>Primer A</i> (senso)	1,25 µl
<i>Primer B</i> (anti-senso)	1,25 µl
Taq DNA polimerase	0,2 µl
DNA (amostra)	1,0 µl
Volume final	25 µl

Fonte: BABADOPULOS, 2001.

A seguir encontram-se nas tabelas 5, 6, 7 e 8 as condições de amplificação para cada gênero bacteriano.

Tabela 5 - Condições de amplificação para as amostras de *Enterococcus* spp. e *Pediococcus* spp. – São Paulo – 2008/2009

Programa 1 – <i>Enterococcus</i> spp e <i>Pediococcus</i> spp.		
Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
94°C	1 min	
58°C	1 min	34 ciclos
72°C	1 min	
72°C	10 min	Extensão final

Tabela 6 - Condições de amplificação para as amostras de *Lactococcus* spp. – São Paulo – 2008/2009

Programa 2 – <i>Lactococcus</i> spp.		
Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1 ciclo
94°C	1 min	
61,7°C	1 min	39 ciclos
72°C	1 min	
72°C	10 min	Extensão final

Tabela 7 - Condições de amplificação para as amostras de *Lactobacillus* spp. – São Paulo – 2008/2009

Programa 3 – <i>Lactobacillus</i> spp.		
Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1 ciclo
95°C	30 s	
55°C	30 s	44 ciclos
72°C	30 s	
72°C	10 min	Extensão final

Tabela 8 - Condições de amplificação para as amostras de *Bifidobacterium* spp. – São Paulo – 2008/2009

Programa 4 – <i>Bifidobacterium</i> spp.		
Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
94°C	1 min	
55°C	1 min	44 ciclos
72°C	1 min	
72°C	10 min	Extensão final

3.4.5 Detecção do produto amplificado

O sistema de análise dos fragmentos amplificados foi conduzido através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 1mM) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (10 V/ 1 cm de gel) (MORENO, 1999). A visualização dos fragmentos amplificados foram feitas com a adição do corante *BlueGreen*® (LGC Biotecnologia) junto as amostras através de transiluminação do gel em luz ultravioleta.

Em todos os procedimentos acima descritos foram utilizados controles positivos e negativos (Tabelas 9 e10).

Tabela 9 - Controles positivos utilizados para cada gênero bacteriano – São Paulo – 2008/2009

Gêneros Bacterianos	Controles positivos
<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
<i>Lactococcus</i> spp	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 7962
<i>Bifidobacterium</i> spp	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703
<i>Enterococcus</i> spp	<i>Enterococcus</i> *
<i>Pediococcus</i> spp	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042

* *Enterococcus faecium* isolado na tese de doutorado LEME, I. L., 1998.

Tabela 10 - Controles negativos utilizados para cada gênero bacteriano – São Paulo – 2008/2009

Gêneros Bacterianos	Controles positivos
<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Escherichia coli</i> K12 ¹
<i>Lactococcus</i> spp	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
<i>Bifidobacterium</i> spp	<i>Escherichia coli</i> K12 ¹
<i>Enterococcus</i> spp	<i>Salmonella</i> Typhimurium ¹
<i>Pediococcus</i> spp	<i>Salmonella</i> Typhimurium ¹

1. Amostra pertencente ao Laboratório de Ornitopatologia – FMVZ/USP.

3.5 PROVAS BIOQUÍMICAS ESPECÍFICAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA

Nas amostras que se confirmaram positivas na técnica da PCR para o gênero bacteriano, realizou-se provas bioquímicas específicas para a identificação da espécie bacteriana. Para a diferenciação das espécies em cada um dos gêneros, foram utilizados um conjunto de substratos. As provas utilizadas para a identificação de *Enterococcus* spp. foram: motilidade, arginina, pirrolidonil arilamidase (PYR) e oxidação-fermentação de manitol, sorbitol, arabinose, rafinose, melibiose e sorbose. Para *Pediococcus* spp. utilizou-se: o crescimento à 35°C, 40°C, 50°C, pH 4.2 e pH 8.5. Para *Lactococcus* spp. as reações de: motilidade, arginina e oxidação-fermentação de lactose, manitol e rafinose. Para *Lactobacillus* spp. as provas de: motilidade, arginina, oxidação-fermentação de lactose, manitol, rafinose, sacarose, amidalina, salicina, manose, melizitose, frutose, ramnose, arabinose, sorbitol, glicose, melibiose, esculina, xilose e trealose. E para *Bifidobacterium* spp. realizou-se a fermentação de: arabinose, rafinose, sorbitol, sacarose, manitol, salicina e melibiose (HOLT et al., 1994; SALMINEN et al., 2004; KONEMAN et al., 2005; MURRAY et al., 2007). Este último foi realizado em anaerobiose proporcionado pela jarra de anaerobiose (Probac do Brasil®) com o gerador de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil®). É necessário ressaltar que nem sempre se utilizou todos os açúcares com as diferentes amostras bacterianas, pois as provas foram realizadas

nas mesmas até o momento em que a espécie bacteriana era determinada com precisão.

4 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em tópicos e organizados em tabelas e gráficos para uma melhor compreensão.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS

4.1.1 Bactérias obtidas de fezes de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro

Das fezes coletadas das vinte e seis (26) aves de vida livre provenientes do Projeto Papagaio-verdadeiro foram isolados, através da análise morfológica e provas bioquímicas, duzentos e quatro (204) colônias bacterianas, dentre estas cento e trinta (130) compatíveis com *Enterococcus* spp., quarenta e sete (47) com *Pediococcus* spp., dezessete (17) com *Lactobacillus* spp., cinco (5) *Lactococcus* spp. e cinco (5) *Bifidobacterium* spp.. A técnica de PCR confirmou cento e sessenta (160) destas colônias, sendo esta cento e vinte (120) *Enterococcus* spp., vinte e quatro (24) *Pediococcus* spp., nove (9) *Lactobacillus* spp., cinco (5) *Bifidobacterium* spp. e dois (2) *Lactococcus* spp..

O número de colônias isoladas em cada ave, assim como os gêneros bacterianos e a proporção de colônias confirmadas pela técnica da PCR estão representados na tabela 11. Os resultados indicaram que das duzentos e quatro (204) colônias isoladas nas vinte e seis (26) aves de vida livre pertencentes ao Projeto Papagaio-verdadeiro, a maior frequência de isolamentos confirmados nas provas bioquímicas foi do gênero *Enterococcus* com 63,7%, seguido do gênero *Pediococcus* com 23% dos isolamentos e o gênero *Lactobacillus* com 8,3%. As menores frequências de isolamento ficaram com os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactococcus* com 2,5% cada um deles. Houve uma média de isolamento por ave de 7,85 colônias. Não necessariamente o isolamento de maior número de colônias nas

aves permitiu a identificação de mais gêneros, por exemplo, na ave 25 isolaram-se 4 colônias e identificaram-se 3 gêneros, comparativamente da ave 16 onde foram isoladas 11 colônias e somente se conseguiu identificar 3 gêneros bacterianos. A tabela 11 também demonstra que em nenhuma ave foi demonstrado os cinco gêneros bacterianos, somente em três aves puderam ser identificadas quatro gêneros de bactérias ácido-láticas, na ave número 4 não foi identificada nenhuma colônia do gênero *Bifidobacterium*, na ave número 11 não foi identificado *Lactobacillus*, e na ave 21 não se identificou nenhuma colônia do gênero *Lactococcus*.

Tabela 11 - Resultados da identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro – São Paulo – 2008/2009

(Continua)

Nº da ave	Nº de colônias isoladas	Identificação do gênero									
		<i>Bifidobacterium</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Lactobacillus</i>		<i>Lactococcus</i>		<i>Pediococcus</i>	
		Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²
1	8	-	-	4	4	-	-	-	-	4	2
2	4	-	-	2	2	2	0	-	-	-	-
3	6	-	-	5	5	-	-	-	-	1	0
4	13	-	-	4	3	5	4	1	0	3	3
5	10	-	-	8	7	-	-	-	-	2	1
6	4	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-
7	6	-	-	5	5	-	-	-	-	1	0
8	8	1	1	6	5	-	-	-	-	1	1
9	2	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-
10	8	-	-	5	4	-	-	1	0	2	1
11	12	1	1	7	6	-	-	1	1	3	2
12	9	-	-	8	8	-	-	-	-	1	1
13	6	-	-	5	4	-	-	-	-	1	1
14	8	-	-	4	3	3	3	-	-	1	0
15	7	-	-	6	6	-	-	1	0	-	-
16	11	-	-	8	8	-	-	-	-	3	2
17	9	-	-	7	7	-	-	1	1	1	1
18	5	-	-	3	3	-	-	-	-	2	0
19	11	-	-	6	6	1	1	-	-	4	4
20	11	-	-	5	5	2	0	-	-	4	2

Tabela 11 - Resultados da identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro – São Paulo – 2008/2009

(Conclusão)

Nº da ave	Nº de colônias isoladas	Identificação do gênero									
		<i>Bifidobacterium</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Lactobacillus</i>		<i>Lactococcus</i>		<i>Pediococcus</i>	
		Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²
21	9	1	1	6	5	1	0	-	-	1	0
22	11	-	-	7	7	-	-	-	-	4	0
23	8	1	1	4	4	-	-	-	-	3	0
24	8	-	-	4	4	-	-	-	-	4	2
25	4	1	1	2	1	1	0	-	-	-	-
26	6	-	-	3	3	2	1	-	-	1	1
Total de colônias	204	5	5	130	120	17	9	5	2	47	24
Aves positivas/Total aves	-----	5/26	5/26	26/26	26/26	8/26	4/26	5/26	5/26	21/26	14/26

1. Amostras suspeitas pela série bioquímica; 2. Amostras confirmadas pela prova da PCR.

Na tabela 11 pode-se verificar também que a confirmação pela técnica de PCR apresentou excelentes resultados para o gênero *Bifidobacterium*, onde os cinco (5) isolados foram confirmados nos testes bioquímicos, e para o *Enterococcus* onde 92,3% das colônias foram confirmadas nas provas bioquímicas. Para os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, os resultados confirmados pela técnica de PCR chegaram somente a 50% das amostras sabidamente positivas após os testes bioquímicos. O gráfico 1 mostra que tanto os testes bioquímicos como o teste da PCR apresentaram um comportamento similar na detecção dos gêneros bacterianos *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, com mais de 90% das colônias confirmadas em ambos os testes. Para os outros três gêneros a confirmação somente pôde ser feita em 40% das colônias de *Lactococcus*, 51% das colônias de *Pediococcus* e 52% das de *Lactobacillus*.

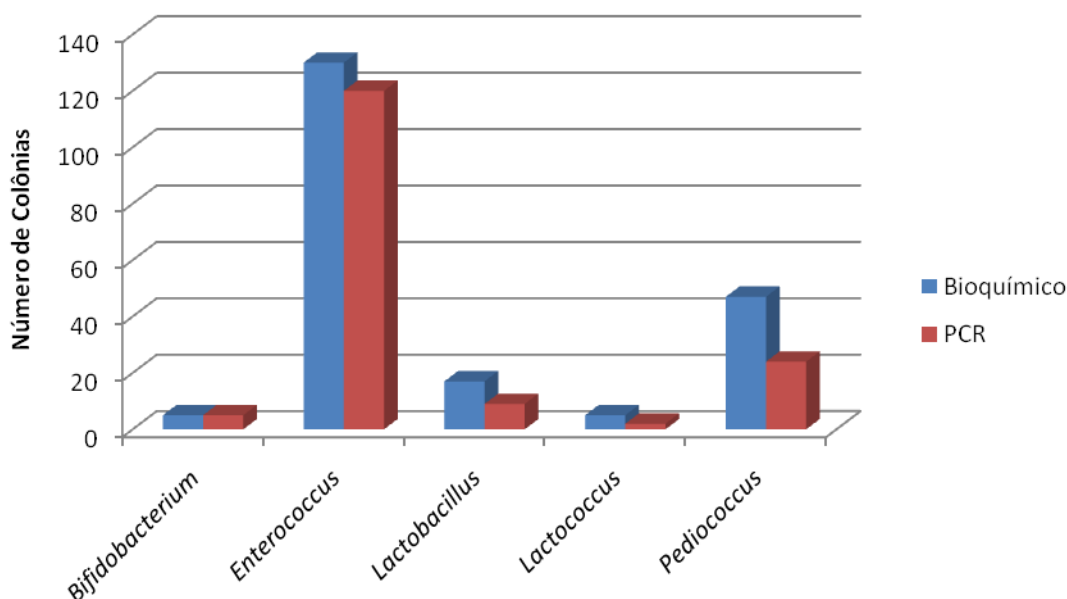


Gráfico 1 - Comparação ilustrativa entre as provas bioquímicas e de PCR dos gêneros bacterianos isolados de aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro

4.1.2 Bactérias obtidas de fezes de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zootech

Das fezes coletadas das dezessete (17) aves de cativeiro provenientes do criadouro comercial Amazona Zootech foram isoladas, através da análise morfológica e provas bioquímicas, cento e sessenta e sete (167) colônias bacterianas, sendo que sessenta e uma (61) eram compatíveis com *Pediococcus* spp., sessenta (60) com *Enterococcus* spp., trinta (30) com *Lactobacillus* spp., doze (12) *Lactococcus* spp. e quatro (4) *Bifidobacterium* spp. A técnica de PCR confirmou cento e cinquenta e duas (152) destas colônias, sendo estas cinquenta e oito (58) *Enterococcus* spp., cinquenta e quatro (54) *Pediococcus* spp., vinte e sete (27) *Lactobacillus* spp., dez (10) *Lactococcus* spp. e três (3) *Bifidobacterium* spp.

O número de colônias isoladas em cada ave, assim como os gêneros bacterianos e a proporção de colônias confirmadas pela técnica da PCR estão representados na tabela 12. Os resultados indicam que das 167 colônias isoladas das 17 aves do criadouro comercial Amazona Zootech, a maior frequência de isolamentos confirmados nas provas bioquímicas foi do gênero *Pediococcus* spp. com 36,5%, seguido do gênero *Enterococcus* com 36% dos isolamentos e o gênero *Lactobacillus* com 18%. Os gêneros isolados com menor frequência foram *Lactococcus* com 7% e *Bifidobacterium* com 2,5%. Houve uma média de isolamento por ave de 9,82 colônias. Não necessariamente o isolamento de maior número de colônias nas aves permitiu a identificação de mais gêneros, por exemplo, na ave 2 isolaram-se 4 colônias e identificaram-se 3 gêneros, comparativamente com a ave 5 onde isolaram-se 14 colônias e somente se conseguiu identificar 3 gêneros bacterianos. A tabela 12 também demonstra que em nenhuma ave foram confirmados os cinco gêneros bacterianos, somente em quatro aves puderam ser identificadas quatro gêneros de bactérias ácido-láticas. Nas aves 1, 9, 10 e 13 não foi identificada nenhuma colônia do gênero *Bifidobacterium*.

Tabela 12 - Resultados da identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zotech– São Paulo – 2008/2009

Nº da ave	Nº de colônias isoladas	Identificação do gênero									
		<i>Bifidobacterium</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Lactobacillus</i>		<i>Lactococcus</i>		<i>Pediococcus</i>	
		Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²
1	11	-	-	4	4	5	5	1	1	1	1
2	4	1	1	1	1	2	2	-	-	-	-
3	5	-	-	4	4	-	-	-	-	1	1
4	5	1	1	2	2	-	-	-	-	2	2
5	14	-	-	4	3	4	3	-	-	6	5
6	7	-	-	5	5	-	-	-	-	2	2
7	8	1	0	1	1	1	0	1	1	4	4
8	9	1	1	5	5	1	1	1	0	1	0
9	12	-	-	3	3	1	1	1	1	7	6
10	8	-	-	3	2	1	1	2	2	2	1
11	10	-	-	3	3	3	2	-	-	4	3
12	12	-	-	6	6	2	2	1	0	3	3
13	19	-	-	6	6	7	7	4	4	2	2
14	8	-	-	3	3	2	2	-	-	3	2
15	11	-	-	3	3	1	1	-	-	7	7
16	13	-	-	4	4	-	-	1	1	8	7
17	11	-	-	3	3	-	-	-	-	8	8
Total de colônias	167	4	3	60	58	30	27	12	10	61	54
Aves positivas/Total aves	-----	4/17	3/17	17/17	17/17	12/17	12/17	8/17	6/17	16/17	15/17

1. Amostras suspeitas pela série bioquímica; 2. Amostras confirmadas pela prova da PCR.

Na tabela 12, pode-se verificar também que a confirmação pela técnica da PCR mostrou excelente resultado para todos os gêneros bacterianos, porém destacam-se os gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus* que tiveram 96,6% das colônias confirmadas nas provas bioquímicas, seguida de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* que tiveram 90%, 88,5% e 75% das colônias confirmadas nas provas bioquímicas, respectivamente. O gráfico 2 mostra que tanto os testes bioquímicos quanto o teste de PCR tiveram um comportamento similar na detecção dos gêneros bacterianos, com mais de 80% de confirmação para todos os gêneros com exceção do *Bifidobacterium*, onde foram identificadas 3 de 4 colônias isoladas (75%).

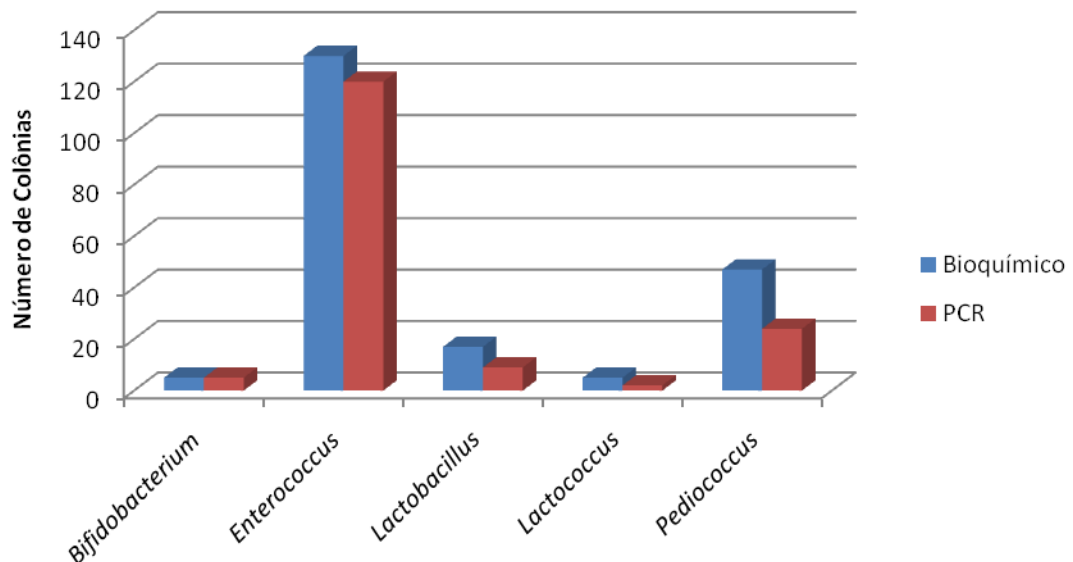


Gráfico 2 - Comparação ilustrativa entre as provas bioquímicas e de PCR dos gêneros bacterianos isolados das aves de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zotech

4.1.3 Bactérias obtidas de fezes de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de cativeiro do criadouro comercial Asas do Brasil

Das fezes coletadas das nove (9) aves de cativeiro provenientes do criadouro comercial Asas do Brasil foram isoladas, vinte e sete (27) colônias bacterianas, uma média de três (3) colônias bacterianas por ave, através da análise morfológica e provas bioquímicas. Das colônias isoladas dezoito (18) foram compatíveis com *Enterococcus* spp. e oito (8) com *Pediococcus* spp. A técnica de PCR confirmou vinte (20) destas colônias, sendo quatorze (14) *Enterococcus* spp. e seis (6) *Pediococcus* spp.

O número de colônias isoladas em cada ave, assim como os gêneros bacterianos e a proporção de colônias confirmadas pela técnica da PCR estão representados na tabela 13. Os resultados indicaram a identificação de apenas 2 gêneros bacterianos entre as 27 colônias isoladas das nove (9) aves de cativeiro pertencentes ao criadouro comercial Asas do Brasil, sendo o gênero *Enterococcus* o que apresentou maior frequência de isolamentos confirmados nas provas bioquímicas com 70,3%, seguido do gênero *Pediococcus* com 29,7% dos isolamentos. Não necessariamente o isolamento de maior número de colônias nas aves permitiu a identificação de mais gêneros, por exemplo, na ave 3 isolaram-se 3 colônias e identificaram-se 2 gêneros e nas aves 4 e 6 isolaram-se 4 colônias e somente se conseguiu identificar 1 gênero bacteriano.

Tabela 13 - Resultados da Identificação dos gêneros bacterianos através das provas bioquímicas e de PCR, nas aves de cativeiro do criadouro comercial Asas do Brasil- São Paulo – 2008/2009

Nº da ave	Nº de colônias isoladas	Identificação do gênero									
		<i>Bifidobacterium</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Lactobacillus</i>		<i>Lactococcus</i>		<i>Pediococcus</i>	
		Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²	Bioq ¹	PCR ²
1	2	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-
2	3	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-
3	3	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2
4	4	-	-	3	2	-	-	-	-	1	0
5	2	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
6	4	-	-	4	4	-	-	-	-	-	-
7	3	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2
8	3	-	-	2	1	-	-	-	-	1	1
9	3	-	-	2	1	-	-	-	-	1	0
Total de colônias	27	0	0	19	14	0	0	0	0	8	6
Aves positivas/Total aves	-----	0/9	0/9	9/9	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9	6/9	4/9

1. Amostras suspeitas pela série bioquímica; 2. Amostras confirmadas pela prova da PCR.

Na tabela 13 pode-se verificar também que a confirmação pela técnica da PCR apresentou bom resultado para os dois gêneros bacterianos, com mais de 70% de colônias confirmadas em ambos os casos. O gênero *Pediococcus* foi confirmado em 75% e o *Enterococcus* em 73,6% das colônias nas provas bioquímicas. O gráfico 3 mostra que tanto os testes bioquímicos como o teste da PCR tiveram um comportamento similar na detecção do gênero *Pediococcus*, no entanto para o *Enterococcus* a PCR somente conseguiu confirmar 73% das amostras que foram positivas nas provas bioquímicas.

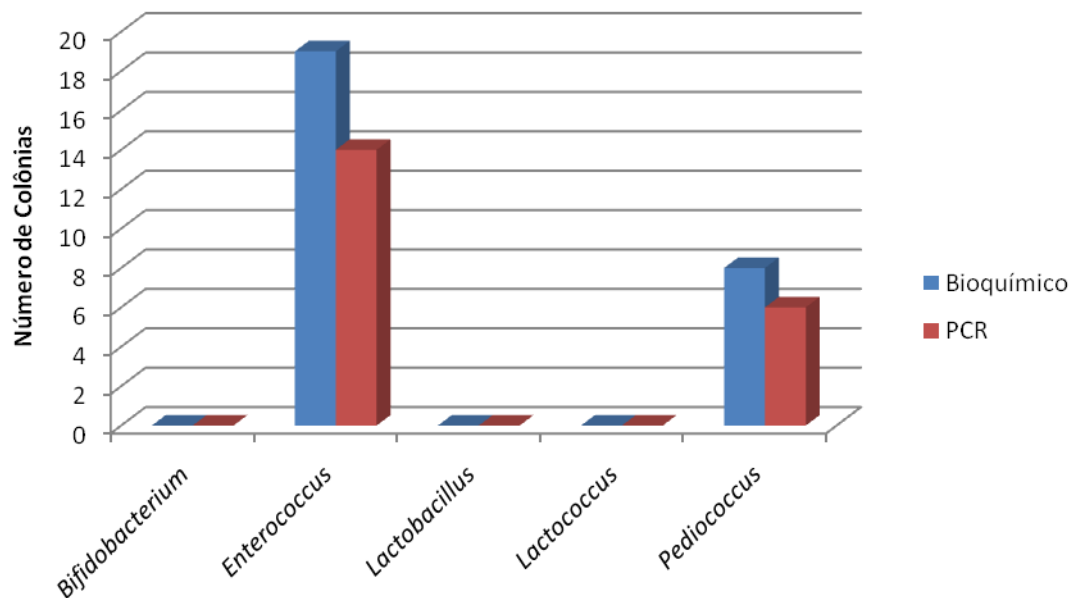


Gráfico 3 -Comparação ilustrativa entre as provas bioquímicas e de PCR dos gêneros bacterianos isolados das aves de cativeiro do criadouro comercial Asas do Brasil

As tabelas 11, 12 e 13 mostram os gêneros bacterianos isolados das 52 amostras de aves de vida livre (Projeto Papagaio-verdadeiro) e de aves em cativeiro (criadouros comerciais Amazona Zootech e Asas do Brasil). Os gêneros identificados através das provas bioquímicas e pelo PCR indicaram que o gênero *Enterococcus* estava presente em todas as amostras, o gênero *Pediococcus* foi encontrado em 63,46% das aves (33 amostras positivas), o gênero *Lactobacillus* foi identificado e confirmado em 30,76% das aves (16 amostras), o gênero *Lactococcus* em 21,15% das aves (11 amostras) e o gênero *Bifidobacterium* somente foi isolado em 15,38% das aves (8 amostras). O gráfico 4 mostra que apesar da diferença numérica das amostras procedentes das três origens, houve predomínio dos gêneros *Enterococcus* e *Pediococcus*.

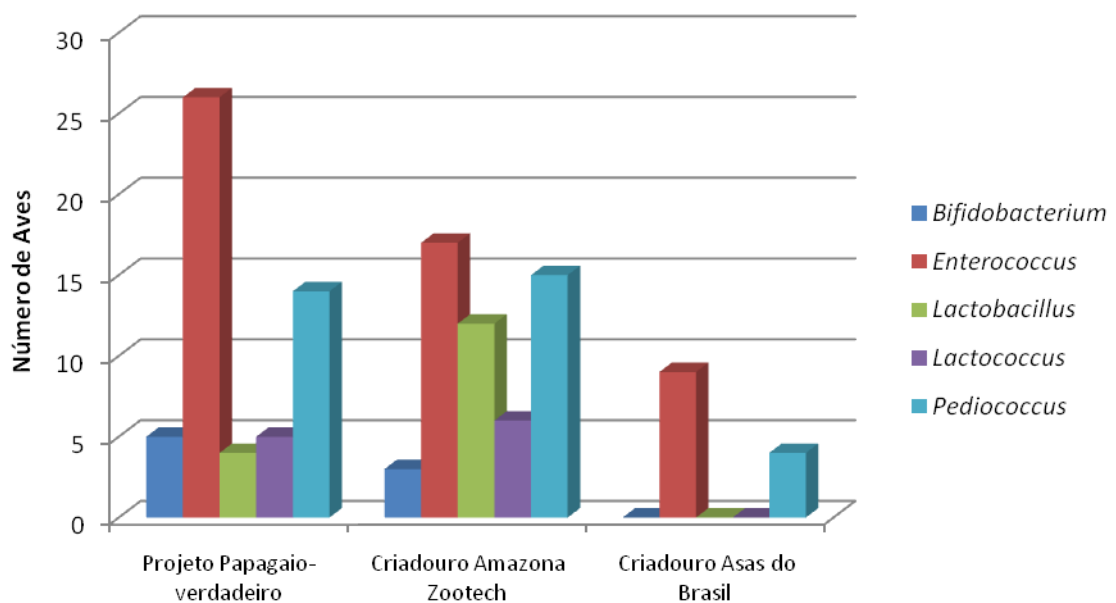


Gráfico 4 -Gêneros bacterianos isolados de aves de vida livre e de cativeiro

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS

4.2.1 Análise dos resultados referentes às espécies de *Enterococcus*

A tabela 14 mostra que do papagaio *Amazona aestiva* independentemente da origem, foram isoladas doze (12) espécies de *Enterococcus*. Cinco delas apresentaram maior ocorrência: *E. faecium* com 32,3% do total de colônias isoladas, *E. faecalis* com 29,17%, *E. sp.* com 13,02%, *E. hirae* com 10,94% e *E. raffinosus* com 6,25%. A tabela 14 também mostra que de doze espécies de *Enterococcus* identificadas, onze (11) delas estiveram presentes nas amostras de aves de vida livre pertencentes ao Projeto Papagaio-verdadeiro, nove (9) foram isoladas e identificadas nas amostras de aves procedentes do criadouro Amazona Zotech e somente três (3) nas amostras de aves pertencentes ao criadouro Asas do Brasil. Verificou-se que do número total de colônias de *Enterococcus* isoladas e identificadas 62,5% pertencia às aves de vida livre. De um total de 52 aves estudadas, as diferentes espécies de *Enterococcus* foram isoladas de todas as aves do Projeto Papagaio-verdadeiro, de todas as aves do criadouro Amazona Zotech e de todas as aves do criadouro Asas do Brasil, como mostram as tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 14 - Resultados da identificação de espécies de *Enterococcus* – São Paulo – 2008/2009

Espécies Bacterianas	Origem						Total de aves	Total de colônias
	Projeto Papagaio-verdadeiro (N° total aves = 26)		Amazona Zotech (N° total aves = 17)		Asas do Brasil (N° total aves = 9)			
	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias		
<i>E. faecium</i>	20	47	8	10	5	5	33	62
<i>E. faecalis</i>	18	37	12	19	0	0	30	56
<i>Enterococcus</i> sp.	11	13	12	12	3	3	26	28
<i>E. hirae</i>	8	12	8	9	0	0	16	21
<i>E. raffinosus</i>	6	6	0	0	4	6	10	12
<i>E. ratti/villorum</i>	1	1	4	5	0	0	5	6
<i>E. sp.</i> CDC PNS-E1	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>E. sp.</i> CDC PNS-E2	1	1	1	1	0	0	2	2
<i>E. gallinarum</i>	1	1	1	1	0	0	2	2
<i>E. avium</i>	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>E. italicus</i>	1	1	0	0	0	0	1	1
Total de colônias	-----	120	-----	58	-----	14	-----	192

O gráfico 5 mostra que apesar de existir uma diferença no número de amostras e espécies isoladas de aves das três origens estudadas, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* foram as espécies isoladas com maior ocorrência, apresenta também maior diversidade de espécies nas aves procedentes do Projeto Papagaio-verdadeiro quando comparadas com as aves procedentes de cativeiro.

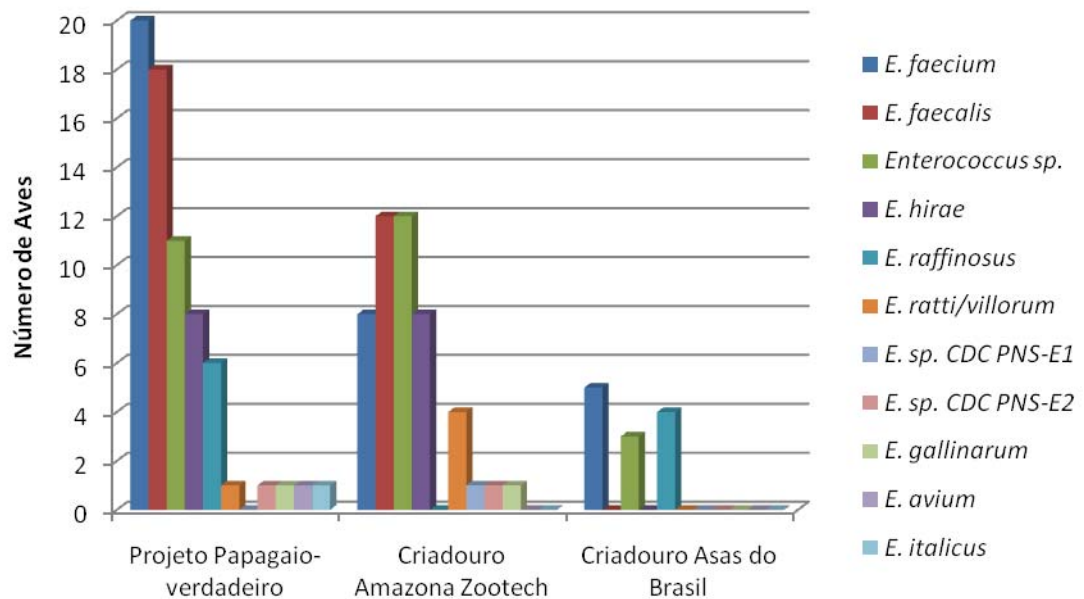


Gráfico 5 - Espécies de *Enterococcus* isoladas de aves de vida livre e de cativeiro

4.2.2 Análise dos resultados referentes às espécies de *Pediococcus*.

A tabela 15 mostra que do papagaio *Amazona aestiva* independentemente da origem, foram isoladas seis (6) espécies de *Pediococcus*. A espécie *P. pentosaceus* aparece duas vezes devido algumas amostras terem apresentado diferenciações em sua série bioquímica, uma delas é a prova de NaCl 6,5% negativo. *Pediococcus pentosaceus* NaCl 6.5% negativo apresentou maior ocorrência com 60,71% do total de colônias isoladas, seguido do *P. pentosaceus*, NaCl 6,5% positivo, com 15, 47%, *P. dextrinicus* e *A. urinaeequi* com 7,14%, *P. parvulus* com 4,76% e *T. halophilus* com 1,2%. A Tabela 15 também mostra que das seis (6) espécies de *Pediococcus* identificadas, três (3) delas estiveram presentes nas amostras de aves de vida livre pertencentes ao Projeto Papagaio-verdadeiro, incluindo os dois tipos de *P. pentosaceus*, seis (6) foram isoladas e identificadas nas amostras de aves de cativeiro procedentes do criadouro Amazona Zotech e somente duas (2) nas amostras de aves de cativeiro pertencentes ao criadouro Asas do Brasil. Observou-se com relação ao número total de colônias de *Pediococcus* isoladas e identificadas que 62,3% pertenciam às aves do criadouro Amazona Zotech. De um total de 52 aves estudadas, as diferentes espécies de *Pediococcus* foram isoladas de 14 aves de um total de 26 aves de vida livre, de 15 de 17 aves do criadouro Amazona Zotech e, de quatro (4) de um total de nove (9) aves do criadouro Asas do Brasil, como se pode verificar nas tabelas, 11, 12 e 13, sendo que 36,53% das aves estudadas foram negativas para o isolamento de *Pediococcus*.

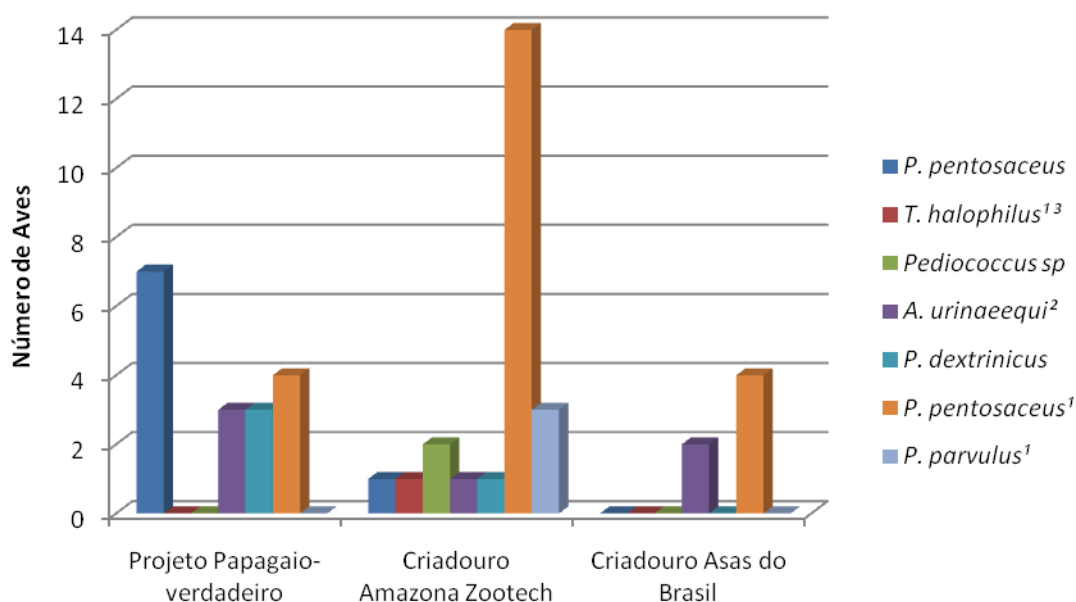
Tabela 15 - Resultados da identificação de espécies de *Pediococcus* – São Paulo – 2008/2009

Espécies Bacterianas	Origem						Total de aves	Total de colônias
	Projeto Papagaio-verdadeiro (N° total aves = 26)		Amazona Zotech (N° total aves = 17)		Asas do Brasil (N° total aves = 9)			
	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias		
<i>P. pentosaceus</i>	7	12	1	1	0	0	8	13
<i>T. halophilus</i> ^{1,3}	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Pediococcus sp</i>	0	0	2	3	0	0	2	3
<i>A. urinaeequi</i> ²	3	3	1	1	2	2	6	6
<i>P. dextrinicus</i>	3	4	1	2	0	0	4	6
<i>P. pentosaceus</i> ¹	4	5	14	42	4	4	22	51
<i>P. parvulus</i> ¹	0	0	3	4	0	0	3	4
Total de colônias	-----	24	-----	54	-----	6	-----	84

1. NaCl 6,5% negativo; 2. Anteriormente classificado como *Pediococcus urinaeequi* e atualmente reclassificado como *Aerococcus urinaeequi*;

3. Anteriormente classificado como *Pediococcus halophilus* e atualmente reclassificado como *Tetragenococcus halophilus*.

O gráfico 6 mostra que *P. pentosaceus* NaCl 6,5% negativo apresentou maior ocorrência nas aves de cativeiro e *P. pentosaceus* NaCl 6,5% positivo, apresentou maior ocorrência nas de aves de vida livre. Também é evidente no gráfico 6 uma maior diversidade de espécies nas aves procedentes do criadouro Amazona Zotech quando comparadas com as aves procedentes do Projeto Papagaio-verdadeiro e do criadouro Asas do Brasil.



1. NaCl 6,5% negativo; 2. Anteriormente classificado como *Pediococcus urinaeequi* e atualmente reclassificado como *Aerococcus urinaeequi*; 3. Anteriormente classificado como *Pediococcus halophilus* e atualmente reclassificado como *Tetragenococcus halophilus*.

Gráfico 6 - Espécies de *Pediococcus* identificadas de aves de vida livre e de cativeiro

4.1.3 Análise dos resultados referentes às espécies de *Lactococcus*.

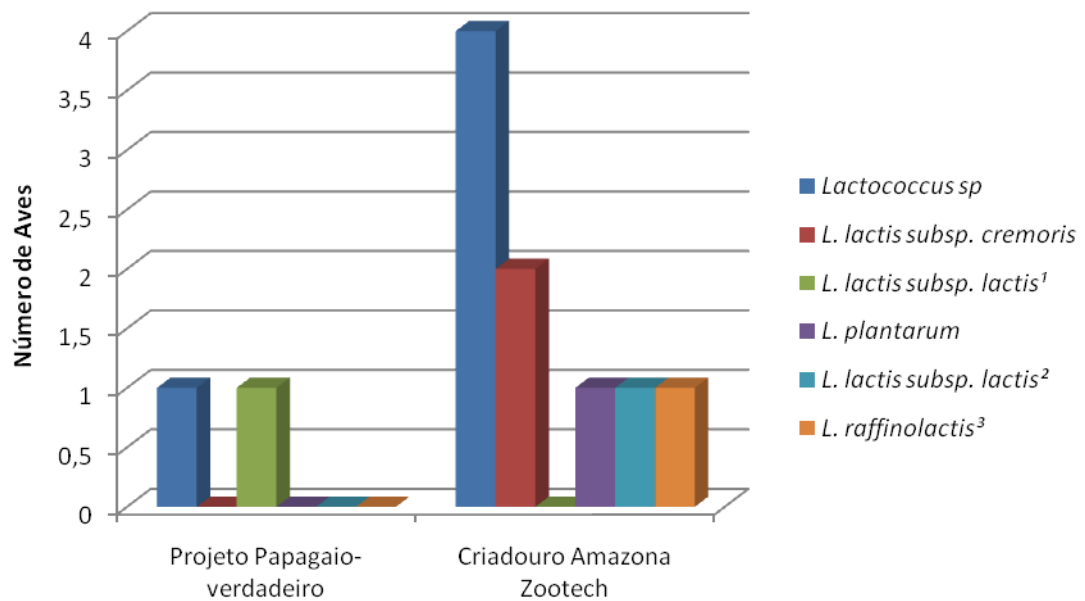
A tabela 16 mostra que do papagaio *Amazona aestiva* independentemente da origem, foram isoladas quatro (4) espécies de *Lactococcus* e dentre essas, duas subespécies. A espécie *L. lactis* subsp. *lactis* aparece duas vezes, pois algumas amostras apresentaram diferenciações em sua série bioquímica, uma delas é a prova de fermentação do manitol negativo e a outra é a prova da fermentação da rafinose negativa. *Lactococcus* sp. apresentou maior ocorrência com 50% do total de colônias isoladas, seguida de *L. lactis* subsp. *cremoris* com 16,66% e as demais com 8,33% cada uma. A tabela 16 mostra estes resultados, assim como, que de quatro (4) espécies de *Lactococcus* identificadas, duas (2) estiveram presentes nas amostras de aves de vida livre pertencentes ao Projeto Papagaio-verdadeiro e quatro (4) foram isoladas e identificadas nas amostras de aves procedentes do criadouro Amazona Zotech, com exceção de *L. lactis* subsp. *lactis* manitol negativo. Dentre o número total de colônias de *Lactococcus* isoladas e identificadas 83,3% pertenciam às aves do criadouro Amazona Zotech. De um total de 52 aves estudadas, 84,61% destas foram negativas para o isolamento de *Lactococcus*. As diferentes espécies de *Lactococcus* foram isoladas de duas (2) aves de um total de vinte e seis (26) aves de vida livre e seis (6) de 17 aves do criadouro Amazona Zotech, como pode se verificar nas tabelas 11 e 12.

Tabela 16 - Resultados da identificação de espécies de *Lactococcus* – São Paulo – 2008/2009

Espécies Bacterianas	Origem				Total de aves	Total de colônias
	Projeto Papagaio-verdadeiro (N° total aves = 26)		Amazona Zootech (N° total aves = 17)			
	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias		
<i>Lactococcus</i> sp	1	1	4	5	5	6
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	0	0	2	2	2	2
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ¹	1	1	0	0	1	1
<i>L. plantarum</i>	0	0	1	1	1	1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ²	0	0	1	1	1	1
<i>L. raffinolactis</i> ³	0	0	1	1	1	1
Total de colônias	-----	2	-----	10	-----	12

1. Manitol negativo; 2. Rafinose negativo; 3. Lactose negativo.

O gráfico 7 mostra que *Lactococcus* sp. foi a espécie mais isolada nas aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech, e também a maior diversidade de espécies nas aves de cativeiro procedentes do criadouro Amazona Zotech quando comparadas com as aves de vida livre procedentes do Projeto Papagaio-verdadeiro.



1. Manitol negativo; 2. Rafinose negativo; 3. Lactose negativo.

Gráfico 7 - Espécies de *Lactococcus* isoladas de aves de vida livre e de cativeiro

4.1.4 Análise dos resultados referentes às espécies de *Lactobacillus*.

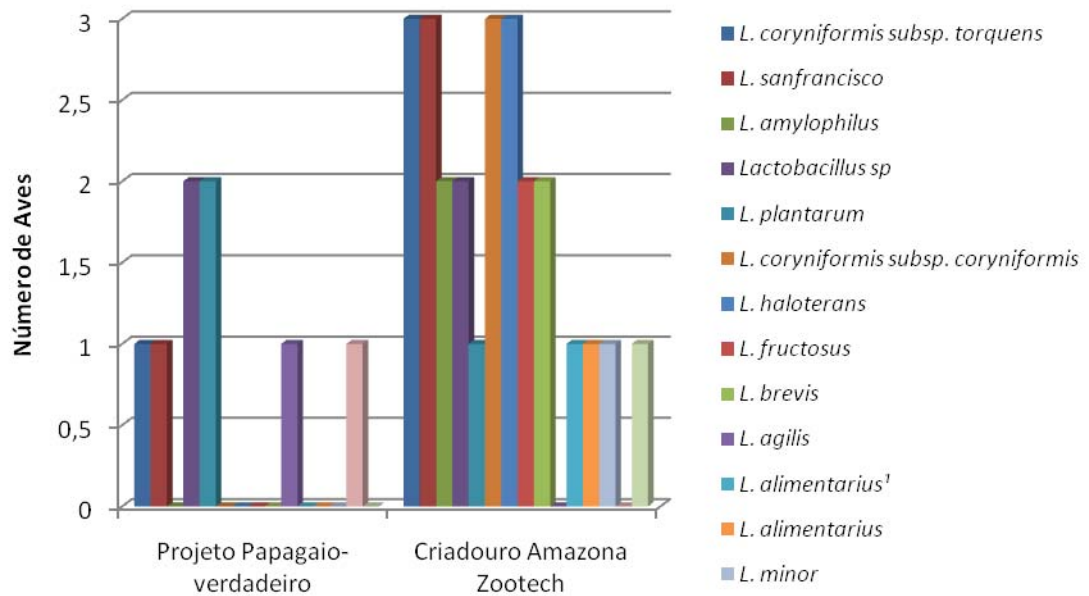
A tabela 17 mostra que do papagaio *Amazona aestiva* independentemente da origem, foram isoladas treze (13) espécies de *Lactobacillus* e dentre essas, duas (2) subespécies. A espécie *L. alimentarius* aparece duas vezes, pois algumas amostras apresentaram diferenciações em sua série bioquímica, uma delas foi a prova de fermentação da salicina, que se apresentou negativa. Quatro espécies tiveram maior ocorrência: *L. coryniformes* subsp. *torquens* com 13,8% do total de colônias isoladas, *L. sanfrancisco*, *L. amylophilus* e *Lactobacillus sp* com 11,11% cada uma. A tabela 17 também mostra que de treze (13) espécies de *Lactobacillus* identificadas, seis (6) delas estiveram presentes nas amostras de aves de vida livre pertencentes ao Projeto Papagaio-verdadeiro e onze (11) foram isoladas e identificadas nas amostras de aves de cativeiro procedentes do criadouro Amazona Zotech, incluindo os dois tipos de *L. alimentarius*. Do número total de colônias de *Lactobacillus* isoladas e identificadas 75% pertenciam às aves do criadouro Amazona Zotech. De um total de 52 aves estudadas, verificou-se que 71,15% foram negativas para o isolamento de *Lactobacillus*. As diferentes espécies de *Lactobacillus* foram isoladas de quatro (4) aves de um total de 26 aves de vida livre e 11 de 17 para as aves do criadouro Amazona Zotech, como mostram as tabelas 11 e 12.

Tabela 17 - Resultados da identificação de espécies de *Lactobacillus* – São Paulo – 2008/2009

Espécies Bacterianas	Origem				Total de aves	Total de colônias
	Projeto Papagaio-verdadeiro (N° total aves = 26)		Amazona Zootech (N° total aves = 17)			
	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias		
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	1	2	3	3	4	5
<i>L. sanfrancisco</i>	1	1	3	3	4	4
<i>L. amylophilus</i>	0	0	2	4	2	4
<i>Lactobacillus</i> sp	2	2	2	2	4	4
<i>L. plantarum</i>	2	2	1	1	3	3
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	0	0	3	3	3	3
<i>L. haloterans</i>	0	0	3	3	3	3
<i>L. fructosus</i>	0	0	2	2	2	2
<i>L. brevis</i>	0	0	2	2	2	2
<i>L. agilis</i>	1	1	0	0	1	1
<i>L. alimentarius</i> ¹	0	0	1	1	1	1
<i>L. alimentarius</i>	0	0	1	1	1	1
<i>L. minor</i>	0	0	1	1	1	1
<i>L. acidophilus</i>	1	1	0	0	1	1
<i>L. helveticus</i> ²	0	0	1	1	1	1
Total de colônias	-----	9	-----	27	-----	36

1. Salicina negativo; 2. Lactose negativo.

O gráfico 8 mostra que a maior diversidade de espécies foi encontrada nas aves procedentes do criadouro Amazona Zootech quando comparadas com as aves originárias do Projeto Papagaio-verdadeiro.



1. Salicina negativo; 2. Lactose negativo.

Gráfico 8 - Espécies de *Lactobacillus* isoladas de aves de vida livre e de cativeiro

4.1.5 Análise dos resultados referentes às espécies de *Bifidobacterium*.

A tabela 18 mostra que do papagaio *Amazona aestiva* independentemente da origem, foram isoladas três (3) espécies de *Bifidobacterium*. A espécie *B. bifidum* foi a que apresentou maior ocorrência com 62,5% do total de colônias isoladas, seguido do *B. breve* com 25% e do *B. longum* com 12,5%. A tabela 18 também mostra que de três espécies de *Bifidobacterium* identificadas, duas (2) estiveram presentes nas amostras de aves de vida livre pertencentes ao Projeto Papagaio-verdadeiro e três (3) foram isoladas e identificadas nas amostras de aves de cativeiro procedentes do criadouro Amazona Zotech. Do número total de colônias de *Bifidobacterium* isoladas e identificadas 62,5% pertenciam às aves de vida livre. Analisando o total de 52 aves estudadas, verificou-se que 84,61% destas foram negativas para o isolamento de *Bifidobacterium*, que as diferentes espécies de *Bifidobacterium* foram isoladas de cinco (5) aves de um total de 26 aves de vida livre e três (3) de 17 aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech, como mostram as tabelas 11 e 12.

Tabela 18 - Resultados da identificação de espécies de *Bifidobacterium* – São Paulo – 2008/2009

Espécies Bacterianas	Origem				Total de aves	Total de colônias
	Projeto Papagaio-verdadeiro (N° total aves = 26)		Amazona Zootech (N° total aves = 17)			
	N° de aves	N° de colônias	N° de aves	N° de colônias		
<i>B. bifidum</i>	4	4	1	1	5	5
<i>B. breve</i>	1	1	1	1	2	2
<i>B. longum</i>	0	0	1	1	1	1
Total de colônias	-----	5	-----	3	-----	8

O gráfico 9 mostra que *B. bifidum* foi a espécie com maior ocorrência de isolamento nas aves de vida livre, e também a maior diversidade de espécies foi identificada nas aves de cativeiro procedentes do criadouro Amazona Zotech quando comparadas com as aves de vida livre procedentes do Projeto Papagaio-verdadeiro.

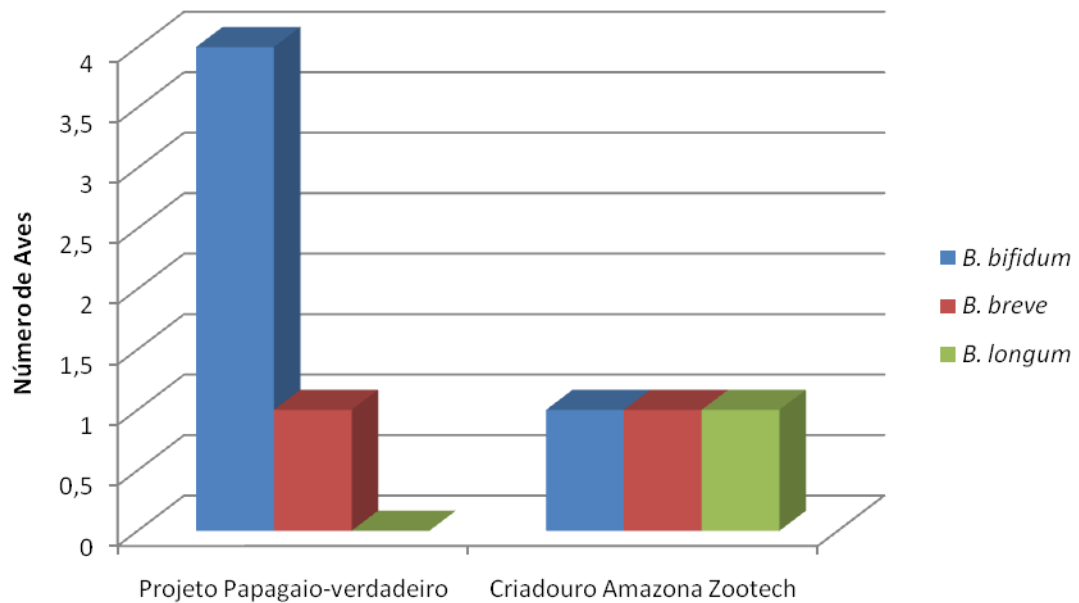


Gráfico 9 - Espécies de *Bifidobacterium* isoladas de aves de vida livre e de cativeiro

5 DISCUSSÃO

O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é a espécie de psitacídeo brasileiro, pertencente ao gênero *Amazona*, mais encontrada em cativeiro como animal de estimação e em zoológicos, devido ao elevado número de aves traficadas. Estes convivem, em sua grande maioria, intimamente com seus proprietários, porém ainda pouco se sabe sobre a microbiota, possíveis doenças e zoonoses destes animais. Conhecer a microbiota intestinal normal destas aves tanto de cativeiro quanto de vida livre é fundamental. Dobbin et al. (2005), afirmaram que o estudo da microbiota de aves silvestres clinicamente saudáveis representa um passo importante para a compreensão de doenças bacterianas que possam afetar as suas populações e espécies semelhantes. O conhecimento da microbiota bacteriana de animais silvestres também pode ser de interesse para a saúde pública (REFSUM et al., 2002), pela importância que elas vem demonstrando na epidemiologia de algumas enfermidades emergentes e zoonoses. Alguns estudos realizados com a microbiota de aves domésticas foram de importância e serviram de referência para este estudo, embora os dados possam ser comparáveis somente com aqueles obtidos de aves de cativeiro e ausentes em aves de vida livre (APAJALAHTI et al., 2004; DUMONCEAUX et al., 2006; ZHOU et al., 2007).

Ao identificar os diferentes gêneros que compõe a microbiota intestinal normal de aves de vida livre é possível discutir e avaliar com clareza a microbiota intestinal normal de aves de cativeiro, embora nestas, diferentes fatores tais como a dieta e o convívio próximo com o ser-humano modifiquem o equilíbrio e as populações das comunidades microbianas no trato gastrointestinal.

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS

Existem na literatura poucos estudos sobre a microbiota intestinal de aves silvestres. Hoefler (1997) e Rupley (1999) afirmaram que a microbiota intestinal normal dos psitacídeos e aves silvestres é composta quase que exclusivamente por

bactérias gram-positiva dos gêneros *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Gaffkya* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* não β -hemolítico e *Staphylococcus* spp. (excluindo *S. aureus*). Porém neste estudo, identificaram-se os gêneros *Enterococcus* em todas as amostras e *Pediococcus* em mais de 60% delas como parte da microbiota de aves de cativeiro e de vida livre. A presença de *Enterococcus* spp. em todas as aves pode ser consequência da ampla disseminação deste gênero em alimentos, plantas, água, solo, fontes fecais eliminadas por outras espécies e pela sua tolerância às condições adversas do meio ambiente (GIRAFFAA, 2002). Por outro lado, a presença de seres humanos também pode influenciar positivamente no isolamento deste gênero, nos quais *Enterococcus* spp. são membros naturais da microbiota (OGIER; SERROR, 2008). Kuntz et al. (2004) relataram a presença deste gênero em aves sugerindo que, apesar da freqüência no ambiente ser variável e a carga fecal eliminada pelas aves silvestres alta, a água era a principal fonte de contaminação. Os resultados deste estudo mostram que *Enterococcus* spp. foi isolado de todas as amostras de aves avaliadas e evidência uma grande diferença com os resultados obtidos por Mundt (1963), na década de 60, no qual apenas 32% de amostras de aves silvestres foram positivas para *Enterococcus*. Estes resultados contraditórios podem sugerir que a presença do homem pode estar influenciando diretamente, não só na composição da microbiota destas aves, como na predominância de alguns gêneros bacterianos.

A alta proporção de isolamento de *Pediococcus* (63,46%) pode ser justificada na alimentação das aves, pois este gênero pode ser amplamente encontrado em sementes e vegetais associados ou não, a processos de fermentação (MUNDT et al., 1969). É necessário mencionar que tanto *Enterococcus* spp. quanto *Pediococcus* spp. são gêneros bacterianos facilmente cultiváveis, resistentes e produtores de bacteriocinas, o que também pode ter contribuído para obtenção destes resultados. As bacteriocinas agem como agentes microbianos e são produzidas para limitar o crescimento de bactérias competidoras ou patogênicas, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* e mesmo algumas outras espécies de *Enterococcus* e *Pediococcus* (OSMANAGAOGLU et al., 2001; POETA et al., 2007).

Dentre os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* verificou-se que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentaram uma maior ocorrência de

isolamento do que *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram descritos, há algum tempo, como parte da microbiota intestinal de diversos animais (MITSUOKA, 1992), porém *Lactococcus* spp. não são freqüentemente relatados. Estes poucos relatos de *Lactococcus* podem estar relacionados à sua similaridade fisiológica com *Enterococcus* spp., podendo assim serem erroneamente classificados. Deasy et al. (2000) relataram a dificuldade de se diferenciar *Enterococcus* spp. de *Lactococcus* spp. e demonstraram divergências sobre as provas bioquímicas indicadas para a definição destes gêneros. Por outro lado, sua presença somente em 11 das amostras estudadas (21,15%), pode ser explicada pela presença deste gênero em plantas, pele de animais, assim como em produtos lácteos (CASALTA; MONTEL, 2008). No entanto, a menor ocorrência na microbiota intestinal pode ser conseqüência de sua pequena capacidade de competir com outras comunidades no trato gastrointestinal.

Observou-se uma maior ocorrência de isolamento de *Lactobacillus* spp. (70,6%) e *Lactococcus* spp. (35,3%) nas aves de cativeiro do criadouro comercial Amazona Zootech em relação às aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro onde foi isolada 15,4% e 19,2%, respectivamente. Nas aves de cativeiro do criadouro Asas do Brasil foram encontrados apenas dois gêneros bacterianos, sendo eles *Enterococcus* e *Pediococcus*, e uma pequena diversidade de espécies. Estes resultados podem estar relacionados ao fornecimento de dietas diferentes, pois como já foi descrito, as dietas influenciam diretamente na população de bactérias intestinais (GIBSON et al., 1996; MOROTOMI, 1997; REID; HILLMAN, 1999). A composição química e a estrutura do alimento determinam a distribuição das espécies na microbiota do trato intestinal, justificado nas diferentes preferências por substratos e necessidades culturais de crescimento que as bactérias residentes apresentam (APAJALAHTI et al., 2004).

A proporção dos gêneros isolados nos três locais de coleta foi diferente como pode ser observado nas tabelas 11, 12 e 13. Estas diferenças podem estar relacionadas com a forma de coleta de amostras das aves, como descrito no item 3.2. As fezes das aves de cativeiro do criadouro Amazona Zootech foram coletadas em papéis alumínio estéreis, afim de que as aves não se estressassem, pois as mesmas eram destinadas a reprodução. Enquanto que nos outros dois locais, devido à distância e a conservação do material, as coletas foram realizadas com

suabes cloacais que continham meio de transporte AMIES (carvão ativado). Os resultados das aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech mostraram que houve isolamento de todos os gêneros bacterianos em uma alta proporção quando comparados com as aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro. Portanto pode-se sugerir, que a utilização de papéis alumínio estéreis seja uma melhor forma de coleta e que o processamento das amostras em um curto período de tempo é fundamental para a preservação das bactérias da microbiota. Da mesma maneira, a utilização de suabes estéreis contendo meio de transporte AMIES (carvão ativado), utilizado na amostragem das aves de vida livre, poderia ter interferido na sobrevivência das bactérias, pois se observou uma menor frequência de isolamento. No entanto, é importante ressaltar que os papéis alumínio estéreis são mais susceptíveis à contaminação ambiental do que os suabes com meio de transporte AMIES. Contudo, conclui-se que a forma de obtenção das amostras é um ponto crucial no isolamento e identificação destas bactérias.

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS

5.2.1 Espécies do gênero *Enterococcus*

Os *Enterococcus* são encontrados nas plantas, no solo e na água, assim como em diferentes produtos lácteos (EATON; GASSON, 2001). A colonização entérica por diferentes espécies de *Enterococcus* pode ser variável de acordo com a espécie e a idade do hospedeiro. Facklam et al. (2002) relataram que em frangos com um dia de idade havia prevalência de *E. faecalis* e conforme os animais foram envelhecendo estes eram substituídos por *E. hirae*, *E. durans* e principalmente *E. faecium*. No entanto, no presente estudo 30,76% das aves apresentaram *E. hirae*, sendo que nenhuma amostra de aves de cativeiro procedente do criadouro Asas do Brasil foi positiva para essa espécie. *Enterococcus durans* não foi isolado de nenhuma amostra coletada.

Enterococcus faecium foi a espécie mais isolada nas aves dos três locais de coleta (63,46%), seguida de *E. faecalis* (57,69%) nas aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro e nas aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech. Estas espécies estão presentes tanto em humanos quanto em animais e, geralmente, são as mais encontradas em alimentos e no meio ambiente (LECLERC et al., 1996; HAMMEREUM et al., 2000). São as espécies mais utilizadas como indicadores de poluição ambiental das águas, pois foram consistentemente identificadas nas fezes de humanos (MANERO et al., 2002). Dessa forma, sugere-se que essa prevalência de isolamento possa ser consequência da interferência direta do homem no habitat de aves de cativeiro, ou da contaminação das águas dos rios no caso das aves de vida livre, uma vez que Moreira et al. (2007) estudando o aporte de nutrientes e sedimentos para a planície em rios do Pantanal, encontraram certo comprometimento da qualidade da água por esgoto ou o uso de fertilizantes em um afluente do rio São Lourenço, que é afluente do rio Cuiabá que deságua no rio Paraguai, local onde foi realizada a coleta das aves de vida livre.

Enterococcus avium foi isolado em apenas uma ave de vida livre. Esta espécie foi originalmente descrita a partir de fezes humanas, porém há relatos de isolamento em fezes de galinhas, sendo estes raros (FACKLAM et al., 2002). Outra espécie identificada ocasionalmente em frangos é *E. gallinarum* (TEIXEIRA et al., 2007), esta foi encontrada em apenas duas aves, uma de vida livre e outra de cativeiro do criadouro Amazona Zotech. A frequência destas espécies é menor não só nas aves como também em humanos (FACKLAM et al., 2002). A participação de alguns membros do gênero *Enterococcus* em infecções é rara, mas ocasionalmente foram descritos alguns casos produzidos por cepas de *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* e *E. hirae*, adquiridas exogenamente, sugerindo portanto, que essas cepas não sejam oriundas da microbiota residente do hospedeiro (KAYSER, 2003).

Isolaram-se também colônias de *E. ratti* ou *E. villorum* de uma ave de vida livre e quatro de cativeiro do criadouro Amazona Zotech, como parte da microbiota residente. *Enterococcus villorum* foi descrito como causador de diarreia em suínos e por isso também é mencionado na literatura como *E. porcicus* (VANCANNEYT et al., 2001; DE GRAEF et al., 2003). Estas espécies apresentam perfil bioquímico bastante semelhante, devido a este fator elas não foram identificadas

individualmente neste estudo. Acreditava-se que *Enterococcus ratti* e *E. villorum* pudessem ser a mesma espécie, sendo diferenciadas apenas pelo fato de *E. ratti* ter sido isolada de ratos e de *E. villorum* ter sido isolado de porcos com diarreia (UHL et al., 1998). Porém Teixeira et al. (2001) através de análises do perfil de proteínas, demonstraram que *E. ratti* e *E. villorum* não eram a mesma espécie.

Assim como *E. ratti* e *E. villorum*, outras espécies de *Enterococcus* isoladas, como *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae*, foram associadas a diferentes doenças (NOSKIN et al., 1995; HIRSH; BIBERSTEIN, 2004), porém é importante ressaltar que todos os animais no momento da coleta apresentavam-se saudáveis, sugerindo portanto que estas bactérias possam estar presentes em equilíbrio no trato intestinal como parte da microbiota residente destas aves, podendo eventualmente se tornar agentes patogênicos oportunistas em casos de imunossupressão.

Os resultados das provas bioquímicas específicas indicaram que foram isolados neste estudo *Enterococcus* CDC PNS E-1, *E. CDC PNS E-2* e *E. italicus* de aves de vida livre e de cativeiro, constituindo-se a primeira descrição destas espécies em psitacídeos. Estas espécies foram recentemente descritas a partir de sangue humano. Carvalho et al. (2008) evidenciaram que *E. italicus* correspondia ao *E. CDC PNS E-1* e propuseram que *E. CDC PNS E-2* fosse denominado de *Enterococcus sanguinicola* sp. nov. No entanto, não há relatos na literatura destas terem sido isoladas de fezes de animais. A avaliação de um maior número de amostras de diferentes procedências seria necessária para se confirmar a presença destas espécies em aves silvestres.

5.2.2 Espécies do gênero *Pediococcus*

As espécies pertencentes ao gênero *Pediococcus*, como *P. pentosaceus*, *P. dextrinicus* e *P. parvulus*, podem ser encontradas na microbiota natural de produtos alimentícios fermentados espontaneamente, propiciando sabor e aroma desejáveis (SEMJONOV; ZIKMANIS, 2008). Ruoff et al. (1988) relataram a presença de algumas espécies de *Pediococcus* no trato digestivo de homens e animais, embora estes não sejam comuns. *Pediococcus pentosaceus* foi a espécie que apresentou

maior ocorrência nos isolamentos (57,7%), correspondendo a maior porcentagem de isolamentos às aves de cativeiro do criadouro Amazona Zootech (50%). Estes resultados sugerem que a origem destas bactérias possa ser da alimentação ou da própria estimulação da dieta nas comunidades microbianas residentes no trato intestinal, constituindo-se em parte da microbiota normal dessas aves, os resultados obtidos contrariam aqueles descritos por Ruoff et al. (1998).

Embora, *P. pentosaceus* seja responsável pela produção de bacteriocinas (OSMANAGAOGLU et al., 2001) que inibem o crescimento de outras populações microbianas, neste estudo foi possível isolar outras 47 espécies de bactérias o que indica que não houve interferência de *P. pentosaceus* ou que a produção destas bacteriocinas não interferiu negativamente nas outras comunidades, como por exemplo *Lactococcus*. Barros et al. (2001) afirmaram que *P. acidilactici* é mais freqüente do que *P. pentosaceus*, porém neste trabalho não se isolou nenhuma amostra de *P. acidilactici* das amostras de aves.

Aerococcus urinaeequi, *P. dextrinicus* e *P. halophilus* foram isolados de seis (6), quatro (4) e uma (1) ave, respectivamente. *Pediococcus urinaeequi* também foi reclassificado como *Aerococcus urinaeequi* por Simpson e Taguchi (1995) e foi descrito como uma das bactérias pertencentes à microbiota de piolhos hematófagos de aves (*Dermanyssus gallinae*) e que podem estar associadas a doenças das mesmas (VALIENTE MORO et al., 2009). *Pediococcus halophilus* foi reclassificado como *Tetragenococcus halophilus* por Collins et al. (1990). Estes dois gêneros são muito semelhantes e dificilmente são distinguidos morfológicamente (HOLZAPFEL et al., 2006). Recentemente foi proposto que a espécie *Pediococcus dextrinicus* seja reclassificada como *Lactobacillus dextrinicus* por Haakensen et al. (2009). Neste estudo, essas outras espécies encontradas foram agrupadas ao gênero *Pediococcus* devido às mesmas apresentarem grande semelhança, compatibilidade bioquímica e serem positivas na prova da PCR. É importante ressaltar que para uma maior precisão na identificação dessas espécies seria necessária a utilização de *primers* específicos para cada uma das espécies para a realização da prova da PCR.

5.2.3 Espécies do gênero *Lactococcus*

Os resultados mostraram uma pequena proporção de isolamento de *Lactococcus*, com 15,39% de aves positivas ao isolamento. *Lactococcus* sp., ou seja, *Lactococcus* que não foram compatíveis com nenhuma espécie descrita até o momento, foram os que apresentaram maior isolamento nas aves com um total de cinco (5) animais, dos quais 80% pertenciam às aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech. *Lactococcus* são encontrados em grande parte dos produtos alimentícios lácticos, no solo, plantas e microbiota dos animais (TEUBER; GEIS, 2006). Dessa forma, sugere-se que as espécies *L. lactis*, *L. plantarum* e *L. raffinolactis* isoladas neste estudo sejam oriundas da alimentação destas aves, tendo sido identificadas com maior frequência nos animais de cativeiro, devido ao contato com produtos industrializados lácticos utilizados como suplementos alimentares dentro do criadouro, quando comparado com as aves de vida livre.

O gênero *Lactococcus* vem sendo considerado um agente patogênico oportunista (FACKLAM; ELLIOT, 1995). A incidência de casos clínicos em humanos e animais associado com esta espécie tem aumentado nos últimos anos (ELLIOT et al., 1991). Uma infecção por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi recentemente relatada em aves aquáticas (GOYACHE et al., 2001). Apesar do isolamento desta espécie, não houve evidências de sinais clínicos nas aves, indicando que esta espécie poderia ser um agente normal da microbiota residente e que, eventualmente, sob algumas condições poderia se comportar como um agente patogênico oportunista.

5.2.4 Espécies do gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus spp. foram isolados de aves de vida livre e de cativeiro do criadouro Amazona Zotech, sendo a maior ocorrência de isolamentos nas amostras de aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech. Estas bactérias crescem e se adaptam a diferentes condições ambientais (HAMMES; HERTEL, 2006), talvez isto

tenha contribuído para a grande variedade de espécies isoladas. Podem ser encontrados em produtos alimentares como probióticos, amplamente distribuídos no meio ambiente e na microbiota de animais e humanos (HAMMES; HERTEL, 2006). Os resultados indicam que seis (6) espécies foram isoladas de amostras de aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro, no entanto quatorze (14) espécies foram isoladas de aves em cativeiro. Essa diferença indica que, provavelmente, os lactobacilos sejam oriundos da alimentação das aves em cativeiro e que ao mesmo tempo a dieta estimule a multiplicação de algumas espécies bacterianas no trato intestinal destas aves. Sabe-se que a alimentação é um fator importante tanto na presença dos gêneros como na diversidade de espécies. Por esta razão, os resultados apontaram que a composição da dieta apresentou uma relação direta com a quantidade e diversidade de espécies encontradas nas aves de cativeiro do criadouro Amazona Zootech. Essa afirmação está respaldada no conhecimento de que neste criadouro é oferecida uma ração comercial enriquecida com probiótico, ao contrário do que deve ocorrer no criadouro Asas do Brasil, onde nenhuma espécie foi isolada. Na literatura, é descrito que as espécies de *Lactobacillus* são espécies-específicas (TANNOCK, 1997). Após serem ingeridas as mesmas possuem capacidade de se aderirem a mucosa do trato intestinal e a colonizarem, havendo assim uma variedade de espécies condizentes com a dieta e a espécie do hospedeiro. As espécies mais descritas em aves comerciais são: *L. acidophilus*, *L. gallinarum*, *L. murinus*, *L. animalis*, *L. salivarius*, *L. agilis*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. delbruekii*, *L. fermentum*, *L. brevis* e *L. plantarum* (APAJALAHTI et al., 2004; HAMMES; HERTEL, 2006; HILMI et al., 2007). No entanto neste estudo, considerando o número total de colônias analisadas, verificou-se que as espécies mais isoladas foram *L. coryniformis* subsp. *torquens* (13,8%), seguida de *L. sanfrancisco*, *L. amylophilus* e *Lactobacillus* sp. (11,11%), colocando em evidência as diferenças entre as aves domésticas e as aves silvestres, mesmo elas sendo mantidas em criadouros.

5.2.5 Espécies do gênero *Bifidobacterium*

As espécies de *Bifidobacterium* podem ser encontradas em diferentes habitats, como por exemplo, na microbiota de humanos e animais, produtos lácteos e esgoto. Assim como os *Lactobacillus*, elas são espécie-específicas e as espécies mais comuns descritas em galinhas, área de maior quantidade de estudos, são os *B. gallinarum* e *B. pullorum* (BIAVATI; MATTARELLI, 2006). Contrariamente ao que revela a literatura para as aves domésticas, neste estudo isolaram-se três espécies, sendo elas *B. bifidum*, *B. breve* e *B. longum*, espécies prevalentes no trato intestinal de humanos (BIAVATI; MATTARELLI, 2006). Apesar da pouca quantidade e variedade dos isolamentos destas espécies, estes resultados sugerem que essas espécies isoladas de aves, tanto de vida livre como de cativeiro, sejam de origem humana. No caso das aves de vida livre, os isolamentos podem ter sido consequência da contaminação de rios com esgoto humano e no caso das aves de cativeiro pode ter sido decorrente de água contaminada e adição de probióticos na alimentação. Neste estudo verificou-se muita dificuldade de trabalhar com as diferentes espécies de bifidobactérias, devido a sua sensibilidade às condições laboratoriais e baixa taxa de sobrevivência, mesmo fornecendo condições especiais e específicas de crescimento. Estes fatores talvez tenham contribuído para o isolamento de poucas amostras.

5.2.6 Comparação entre Provas Bioquímicas e Técnicas Moleculares

Neste trabalho as espécies denominadas como *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Lactococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. são espécies que não foram compatíveis com nenhuma espécie citada na literatura, apesar destas terem sido positivas nas provas da PCR. Como consequência da escassa quantidade de informações sobre a microbiota intestinal de aves silvestres, é possível que essas bactérias possam ser espécies ainda não descritas, porém é necessário que provas adicionais sejam realizadas e que permitam a confirmação deste fato.

Atualmente com o surgimento de técnicas moleculares, como a PCR, a identificação de bactérias que antes podiam ser erroneamente classificadas ou não eram identificadas com precisão pelos exames bioquímicos, foi facilitada. Muitas espécies bacterianas têm sido reclassificadas graças às técnicas moleculares. Isto sugere que as provas bioquímicas possam demonstrar uma suspeita do gênero e/ou espécie bacteriana estudada e não uma confirmação exata. Deasy et al. (2000) afirmaram que no caso de algumas bactérias, como por exemplo os *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp., talvez seja necessário a aplicação de métodos moleculares para a identificação. Corroborando estas afirmações Bej e Mahbubani (1992), Amann et al. (1995) e Reilly e Attwood (1998) publicaram que a metodologia da PCR tem proporcionado resultados rápidos e confiáveis para a detecção de microorganismos que compõe a microbiota, permitindo assim o desenvolvimento de técnicas independentes do cultivo para a análise da diversidade da microbiota intestinal. Os resultados mostrados neste estudo confirmam estas afirmações, indicando que o melhor desempenho da PCR foi para o gênero *Enterococcus* em todos os locais de coleta, seguido de *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*.

O trato gastrointestinal é fundamental para o processamento de nutrientes e fluidos, e também é a maior superfície do corpo em contato com o meio ambiente externo. As bactérias comensais conferem alguns benefícios à saúde do hospedeiro colaborando com a digestão, o desenvolvimento da imunidade intestinal e prevenindo a colonização por bactérias patogênicas (MAGALHAES et al., 2007). Os efeitos das bactérias nas aves hospedeiras em estado selvagem têm recebido escassa atenção, e os efeitos positivos de populações residentes tem sido pouco estudado (MORENO et al., 2003). A sazonalidade e a oferta de alimento na natureza podem interferir na composição da microbiota intestinal das aves de vida livre, porém o conhecimento da mesma é essencial para se determinar as bactérias que predominam no microambiente gastrointestinal e estabelecer quais comunidades microbianas estão presentes nas aves clinicamente saudáveis, dependendo de seu habitat. Nesta área, a utilização e padronização de técnicas moleculares de identificação, de provas bioquímicas e teste de resistência aos antimicrobianos, podem fornecer informações importantes sobre a provável origem de algumas espécies bacterianas. O conhecimento da microbiota intestinal de aves de vida livre também permitirá determinar, por exemplo, as necessidades de formulação

adequada de rações ou de produtos probióticos, que ofereçam equilíbrio e estimulem a presença de comunidades microbianas residentes para as aves de cativeiro. Esta área tem sido pouco explorada e pesquisada em aves silvestres, por esta razão outros estudos são necessários, para uma melhor compreensão da microbiota intestinal destes animais, assim como de suas similaridades e diferenças com as aves domésticas, que permitirá um manejo apropriado e menos empírico desta espécie em cativeiro.

6 CONCLUSÕES

- Os gêneros *Enterococcus* e *Pediococcus*, são os mais freqüentes na microbiota intestinal de papagaios-verdadeiros de cativeiro e de vida livre.
- Há diferenças na ocorrência de gêneros bacterianos identificados na microbiota intestinal de aves de cativeiro dos criadouros comerciais Amazona Zotech e Asas do Brasil, sendo o primeiro composto por *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e o segundo apenas por *Enterococcus* e *Pediococcus*.
- Há diferenças na ocorrência de gêneros bacterianos identificados na microbiota intestinal de aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro e de cativeiro do criadouro Amazona Zotech, sendo que no segundo houve maior ocorrência de isolamentos dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Pediococcus* do que no primeiro.
- A maior diversidade de espécies de *Enterococcus* foi isolada de amostras procedentes de aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro.
- A maior diversidade de espécies de *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* foi isolada de amostras procedentes de aves de cativeiro do criadouro Amazona Zotech.
- *Pediococcus pentosaceus* foi a espécie com maior ocorrência de isolamentos nas aves de vida livre e de cativeiro.
- *Bifidobacterium bifidum* foi a espécie com maior ocorrência de isolamentos nas aves de vida livre do Projeto Papagaio-verdadeiro.

REFERÊNCIAS

- AAFCO. ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS INCORPORATED. Nutrition expert panel review: new rules for feeding pet birds. **Feed Management**, v. 49, n. 2, 1998.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, p. 59-71, 1999.
- AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 143-159, 1995.
- APAJALAHTI, J. H.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 223-232, 2004.
- ATLAS, R. M.; PARKS, L. C. **Handbook of microbiological media**. 2. ed. Nova York: CRC Press, 1997. p. 1588, 1625.
- BABADOPULOS, P. **Padronização de um Sistema de PCR Multiplex para detecção de *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterococcus faecalis* resistente a Vancomicina e *Campylobacter jejuni***. 2001. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- BARROS, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; PERALTA, J. M.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1241-1246, 2001.
- BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H. Applications of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. **PCR Methods and Applications**, v. 13, p. 151-159, 1992.
- BIAVATTI, B.; MATTARELLI, P. The Family Bifidobacteriaceae. In: DWORKIN, M.; FALKON, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: firmicutes, cyanobacteria**, 3. ed. Springer: Nova York, 2006. v. 3, p. 322-382.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 125-131, 2002.
- BIONDI, M.; ZANNINO, L. G. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man. A review. **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 66, n. 1, p. 3-26, 1997.

BONTEN, M. J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 314-325, 2001.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. V. D. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, p. 495-503, 1990.

BRISBIN, J. T.; GONG, J.; SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Reviews**, v. 9, n. 1, p. 101-110, 2008.

CARCIOFI, A. C. Nutrition: order psittaciformes (parrots, macaws, conures). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine and surgery of south american wild animals**, Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 225-236.

CARVALHO, M. G. S.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; SHEWMAKER, P. L.; FALSEN, E.; FACKLAM, R. R.; TEIXEIRA, L. M. Designation of the provisional new *Enterococcus* species CDC PNS E-2 as *Enterococcus sanguinicola* sp. nov., isolated from human blood, and identification of a strain previously named *Enterococcus* CDC PNS E-1 as *Enterococcus italicus* Fortina, Ricci, Mora, and Manachini 2004. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3473-3476, 2008.

CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganism: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 271-273, 2008.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-126, 1998.

COLLINS, M. D.; SAMELIS, J.; METAXOPOULUS, J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, p. 595-603, 1993.

COLLINS, M. D.; WILLIAMS, A. M.; WALBANKS, S. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: Description of *Tetragenococcus* gen. nov. **FEMS Microbiology Letters**, v. 70, p. 255-262, 1990.

COURVALIN, P.; VOSS, W.; RUBENS, C. E. Genetic of *Streptococci*, *Enterococci*, and *Lactococci*. **ASM News**, v. 64, p. 501-504, 1998.

CROCIANI, F.; ALESSANDRINI, A.; MUCCI, M. M.; BIAVATI, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1-2, p. 199-210, 1994.

DE GRAEF, E. M.; DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; COLLINS, M. D.; LEFEBVRE, K.; SWINGS, J.; HAESBROUCK, F. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1069-1074, 2003.

DEASY, B. M.; REA, M. C.; FITZGERALD, G. F.; COGAN, T. M.; BERESFORD, T. P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 510-522, 2000.

DOBBIN, G.; HARIHARAN, H.; DAOUST, P. Y.; HARIHARAN, S.; HEANEY, S.; COLES, M.; PRICE, L.; ANNE MUCKLE, C. Bacterial flora of free-living Double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) chicks on Prince Edward Island, Canada, with reference to enteric bacteria and antibiotic resistance. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n.1, p. 71-82, 2005.

DUBERNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 271-275, 2002.

DUMONCEAUX, T. J.; HILL, J. E.; HEMMINGSEN, S. M.; KESSEL, A. G. V. Characterization of Intestinal Microbiota and Response to Dietary Virginiamycin Supplementation in the Broiler Chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2815-2823, 2006.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

ELLIOT, J. A.; COLLINS, M. D.; PIGOTT, N. E.; FACKLAM, R. R. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2731-2734, 1991.

ELLIOT, J. A.; FACKLAM, R. R. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1296-1298, 1996.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Enterococcus***. [2008?a]. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>>. Acesso em: 3 maio 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Lactococcus***. [2008?b]. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>>. Acesso em: 3 maio 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Lactobacillus***. [2009?a]. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em: 3 maio 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Bifidobacterium***. [2009?b]. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/b/bifidobacterium.html>>. Acesso em: 3 maio 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Pediococcus***. [2009?c]. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/p/pediococcus.html>>. Acesso em: 3 maio 2009.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B. **The Enterococci. Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, 2002. p. 1-54.

FACKLAM, R. R.; ELLIOT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 479-495, 1995.

FELIS, G. E.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1325-1327, 2005.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 132-146.

FIORAMONTI, J.; THRODORU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FORSYTH, J. M.; COOPER, W. T. **Parrots of the world**. 3. ed. Willoughby NSW: Landsdowe, 1989.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FULLER, R.; GIBSON, G. R. Modification of the intestinal flora using probiotics and prebiotics. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. 222, p. 28-31, 1997. Supplement.

GARLICH, J. D. Microbiologia do tracto intestinal aviar. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16., 1999, Peru. **Anais...** Lima: Asociación Latinoamericana de Avicultura, 1999. p. 110-120.

GEDEK, B. Probiotics in animal feeding: effect performance and animal health. **Feed Management**, v. 3, p. 21-24, 1986.

- GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, 1996.
- GIRAFFAA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.
- GODFREE, A. F.; KAY, D.; WYER, M. D. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. S1, p. 110-119, 1997. Suplemento.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.
- GONG, J.; SYU, H.; LIU, T.; GILL, J. J.; CHAMBERS, J. R.; WHEATCROFT, R.; SABOUR, P. M. Effects of zinc bacitracin, bird age, and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1-3, p. 318-322, 2008.
- GOYACHE, J.; VELA, A. I.; GIBELLO, A.; BLANCO, M. M.; BRIONES, V.; GONZÁLEZ, S.; TÉLLEZ, S.; BALLESTEROS, C.; DOMÍNGUES, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: first confirmation in animals. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 884-886, 2001.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.
- HAAKENSEN, M.; DOBSON, C. M.; HILL, J. E.; ZIOLA, B. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 615-621, 2009.
- HAMMEREUM, A. M.; FUSSING, V.; AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C. Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 677-680, 2000.
- HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M.; FALKON, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. 3. ed. Nova York: Springer, 2006. v. 4, p. 320-403.
- HILMI, H. T. A.; SURAKKA, A.; APAJALAHTI, J.; SARIS, P. E. J. Identification of the Most Abundant *Lactobacillus* Species in the Crop of 1- and 5-Week-Old Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 24, p. 7867-7873, 2007.

- HIRSH, D. C.; BIBERSTEIN, E. L. Streptococcus and Enterococcus. In: HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. (Ed.). **Veterinary microbiology**. 2. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2004. p. 159-167.
- HOEFER, H. L. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R. B.; CLUBB, S. L.; DORRESTEIN, G. M.; QUESENBERRY, K. (Ed.). **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1997. p. 419-453.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; STANLEY, T. W. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787 p.
- HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P.; LUDWIG, W.; BACK, W.; DICKS, L. M. T. The genera of *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: DWORKIN, M.; FALKON, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. 3. ed. Nova York: Springer, 2006. v. 4, p. 229-266.
- HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2. p. 365-373, 2001. Suplemento.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.
- JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; ALI, M. A.; JALALUDIN, S. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 70, n. 3, p. 197-209, 1998a.
- JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77, n. 9, p. 1259-1265, 1998b.
- KAMWA, E. B. **Níveis crescentes de lipase exógena em dietas para papagaios verdadeiros (Amazona aestiva) com diferentes taxas de inclusão de óleo de girassol**. 2002. 58 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2002.
- KAVALATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUIN, S.; HO, Y. W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n. 1, p. 139-144, 2003.
- KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 255-262, 2003.
- KLASING, K. C. Avian gastrointestinal anatomy and physiology. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 8, n. 2, p. 42-50, 1999.

KLASING, K. C. Minimizing Amino Acid Catabolism Decreases Amino Acid Requirements. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 11-12, 2009.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103-125, 1998.

KOGUT, M. H.; KLANSING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: introduction an overview. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, p.103-110, 2009.

KOK, R. G.; WAAL, A.; SCHUT, F.; WELLING, G. W.; WEENK, G.; HELLINGWERF, K. J. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strains in infant feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3668-3672, 1996.

KONEMAN, E. W.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRENBERGER, P.; WOODS, G. (Ed.). **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6. ed. Lippincott: Williams and Wilkins, 2005, 1736 p.

KOUTSUS, E.; KLASING, K. C. Factors modulating the avian immune system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian immunology**. Londres, Reino Unido: Academic Press, 2008. p. 323-338.

KUNTZ, R. L.; HARTEL, P. G.; RODGERS, K.; SEGARS, W. I. Presence of *Enterococcus faecalis* in broiler litter and wild bird feces for bacterial source tracking. **Water Research**, v. 38, n. 16, p. 3551-3557, 2004.

KWON, H. S.; YANG, E. H.; LEE, S. H.; YEON, S. W.; KANG, B. H.; KIM, T. Y. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 55-62, 2005.

LAN, Y.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMIGA, S.; WILLIAMS, B. A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chicks. **World's Poultry Science**, v. 61, p. 95-104, 2005.

LARA, L. B. **Biodisponibilidade de aminoácidos em alimentos para papagaios (*Amazona aestiva*) adultos**. 2006. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

LECLERC, H.; DEVRIESE, L. A.; MOSSEL, D. A. A. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 459-466, 1996.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211 p.

LEME, I. L. **Avaliação do perfil de suscetibilidade a antibióticos em amostras de Enterococos de origem aviária em São Paulo**. 1998. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1998.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

MAGALHAES, J. G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S. E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 2, p. 106-115, 2007.

MANERO, A.; VILANOVA, X.; CERDA-CUELLAR, M.; BLANCH, A. R. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of enterococci. **Water Research**, v. 36, p. 2831-2835, 2002.

MITSUOKA, T. **Intestinal Microbiology**. Tokyo: Asakura-shoten, 1990. p. 139-144.

MITSUOKA, T. The human gastrointestinal tract. In: WOOD, B. J. B. (Eds.). **The lactic acid bacteria in health and disease**. Londres: Elsevier Applied Science, 1992. p. 69-144.

MOELLERING JR., R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 1173-1178, 1992.

MOREIRA, M. M.; CHAVEZ, R. M. L.; SILVA, E. L. V.; BARRETO, R. R.; SILVA, F. A. V.; BARROS, L. F.; BARBOSA, D. S.; OLIVEIRA, M. D.; CALHEIROS, D. F. Caracterização limnológica dos rios correntes e Piquiri (MT) em área de planalto e aporte de nutrientes e sólidos suspensos para o Pantanal. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Brasil. **Anais...** Caxambú: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007. p. 1-2.

MORENO, A. M. **Enterite Proliferativa Suína: Aspectos Anatomopatológicos e Epidemiológicos**. 1999. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 1999.

MORENO, J.; BRIONES, V.; MERINO, S.; BALLESTEROS, C.; SANZ, J. J.; TOMÁS, G. Beneficial effects of cloacal bacteria on growth and fledging size in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in Spain. **The Auk**, v.120, n. 3, p. 784-790, 2003.

MOROTOMI, M. Intestinal bacteria and cancer. In: HONSHA, Y. **Intestinal flora and immunity: intestinal infection, allergies, and cancer**. Tokyo: Yakult Honsha, 1997. p. 35-44.

MORRISEY, J. K. Diseases of the upper respiratory tract of companion birds. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 6, n. 4, p. 195-200, 1997.

MORRISEY, J. K. Gastrointestinal diseases of psittacine birds. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 8, n. 2, p. 66-74, 1999.

- MULLIÉ, C.; ODOU, M. F.; SINGER, E.; ROMOND, M. B.; IZARD, D. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p. 129 - 136, 2003.
- MUNDT, J. O.; BEATTIE, W. G.; WIELAND, F. R. Pediococci residing on plants. **Journal of Bacteriology**, v. 98, n. 3, p. 938-942, 1969.
- MUNDT, J. O. Lactic acid streptococci. In: BUTLER J. P. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v. 2. 636 p.
- MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci on plants in a wild environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 141-144, 1963.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. v. 2, 2256 p.
- NAVA, G. M.; BIELKE, L. R.; CALLAWAY, T. R.; CASTANEDA, M. P. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 105-118, 2005.
- NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 8, p. 1788-1793, 1994.
- NOSKIN, G. A.; PETERSON, L. R.; WARREN, J. R. Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis bacteremia : acquisition and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 296-301, 1995.
- OGIER, J. C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 291-301, 2008.
- OSMANAGAOGLU, O.; BEYATLI, Y.; GUNDUZ, U. Isolation and Characterization of Pediocin Producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from Vacuum-Packed Sausages. **Turkish Journal of Biology**, v. 25, p. 133-143, 2001.
- PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 627-631, 2003.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGUERO, G.; GIBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 1597-1602, 1995.
- PLA, J. **Can your pet bird make you sick?** 2006. Disponível em: <<http://www.realmacaw.com/pages/birdsic.html>>. Acesso em: 28 maio 2009.
- POETA, P.; COSTA, D.; ROJO-BEZARES, B.; ZARAZAGA, M.; KLIBI, N.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Detection of antimicrobial activities and

bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. **Microbiological Research**, v. 162, p. 257-263, 2007.

POT, B.; LUDWIG, W.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. (Ed.). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. London: Blackie. 1994. p. 13–89.

PRIMER-BLAST PRIMER DESIGNING TOOL. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>>. Acesso em: 27 mar. 2009.

PRIMERS 3 OUTPUT. 2008. Disponível em: <http://www.primer3_results.cgi>. Acesso em: 31 jul. 2008.

REDDY, G.; ALTAF, M. D.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – a review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 22-34, 2008.

REDFORD, K. H. "The empty forest". **BioScience**, v. 42, n. 6, p. 412-422, 1992.

REFSUM, T.; HANDELAND, K.; BAGGESEN, D. L.; HOLSTAD, G.; KAPPERUD, G. Salmonellae in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5595-5599, 2002.

REID, C. A.; HILLMAN, K. The effects of retrogradation and amylose/amylopectin ratio of starches on carbohydrate fermentation and microbial populations in the porcine colon. **Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 503-510, 1999.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3763–3766, 1999.

REILLY, K.; ATTWOOD, G. T. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 907-913, 1998.

RENTAS. REDE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES. **Primeiro relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres**. Brasília: RENTAS, 2002.

RIBEIRO, L. B.; SILVA, M. G. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 59, n. 4, 2007.

RICE, L. B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S. R.; HUANG, W.; MURRAY, B. E. A potential virulence gene, *hyl*_{Efm}, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 508-512, 2003.

- ROLFE, R. D. Population dynamics of the intestinal tract. In: BLANKENSHIP, L. C. **Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 58-75.
- ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 396-402, 2000. Suplemento.
- ROSSKOPF, W. J.; WOERPEL, R. W. **Diseases of cage and aviary bird**, 3. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996. 1088 p.
- RUOFF, K. L. The “new” catalase-negative, gram-positive cocci. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 18, p. 153-156, 1994.
- RUOFF, K. L.; KURITZKES, D. R.; WOLFSON, J. S.; FERRANO, M. J. Vancomycin-resistant gram-positive bacteria isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2064-2068, 1988.
- RUPLEY, A. E. **Manual de clínica aviária**, São Paulo: Roca, 1999. 598 p.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 2. ed. Nova York: Marcel Dekker, 1998. 633 p.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. C. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 656 p.
- SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 319-331, 2001.
- SANTOS, J. R. G.; TURNES, C. G. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.
- SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 107-133, 1977.
- SCHAT, K.; SKINNER, M. A. Avian immunosuppressive diseases and immune evasion. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian immunology**. Londres, Reino Unido: Academic Press, 2008. p. 299-322.
- SCHLEIFER, K. H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BÄLZ, R.; COLLINS, M. D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 6, p. 183-195, 1985.
- SEIXAS, G. H. F.; MOURÃO, G. M. Nesting success and hatching survival of the Blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v. 73, n. 4, p. 399-409, 2002.
- SEMJONOV, P.; ZIKMANIS, P. Evaluation of novel lactose-positive and exopolysaccharide producing strain of *Pediococcus pentosaceus* for fermented

foods. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 3, p. 851-856, 2008.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The lactic acid bacteria. the genera of lactic acid bacteria**. Londres: Blackie Academic and Professional, 1995. v. 2, p. 16.

SHAPIRO, S. K.; SARLES, W. B. Microorganisms in the intestinal tract of normal chickens. **Journal of Bacteriology**, v. 58, p. 531-544, 1949.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

SIMPSON, W. J.; TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The lactic acid bacteria. the genera of lactic acid bacteria**. Londres: Blackie Academic and Professional, 1995. v. 2, p. 125-172.

STYLES, D. K.; FLAMMER, K. Congo red binding of *Escherichia coli* isolated from the cloacae of psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 35, p. 46-48, 1991.

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 2-15, 2002. Suplemento.

TANNOCK, G. W. Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A.; ISSACSON, R. E. (Ed.). **Gastrointestinal microbiology**, Londres: Chapman and Hall Microbiology Series, 1997. v. 2, p. 187-215

TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. S.; ESPINOLA, M. M. B.; STEIGERWALT, A. G.; DOUGLAS, M. P.; BRENNER, D. J.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1737-1743, 2001.

TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. S.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. v. 1, 2256 p.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; VIANNI, M. C. E.; CARVALHO, M. G. S.; FRACALANZZA, S. E. L.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J.; FACKLAM, R. R. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 664-668, 1996.

TEUBER, M.; GEIS, A. The Genus *Lactococcus*. In: DWORKIN, M.; FALKON, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**.

A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, 3. ed. Nova York: Springer, 2006. v. 4, p. 205-228.

TOUFEXIS, A. "All Gods creatures priced to sell". **Time**, v. 142, n. 3, p. 36-41, 1993.

UHL, J. R.; HOPKINS, M.; ZHANG, S.; LESKE, D. A.; HOLMES, J. M.; COCKERILL, F. R. A new Enterococcus species isolated from neonatal rats with diarrhoeae. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 98., Estados Unidos. **Anais...** Washington: American Society for Microbiology, 1998. p. 480.

ULLREY, D. E.; ALLEN, M. E.; BAER, D. J. Formulated diets versus seed mixtures for psittacines. **Journal of Nutrition**, v. 121, n. 11, p. 193-205, 1991. Suplemento.

VALIENTE MORO, C.; THIOULOUSE, J.; CHAUVE, C.; NORMAND, P.; ZENNER, L. Bacterial taxa associated with the hematophagous mite *Dermanyssus gallinae* detected by 16S rRNA PCR amplification and TTGE fingerprinting. **Research in Microbiology**, v.160, p. 63-70, 2009.

VANCANNEYT, M.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; BAELE, M.; DESCHEEMAER, P.; GOOSSENS, H.; POT, B.; VANDAMME, P.; SWINGS, J.; HAESBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 393-400, 2001.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiology Review**, v. 60, p. 407-438, 1996.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2578-2585, 2001.

ZHANG, B.; TONG, H.; DONG, X. *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2167-2170, 2005.

ZHOU, H.; GONG, J.; BRISBIN, J. T.; YU, H.; SANEI, B.; SABOUR, P.; SHARIF, S. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis technique. **Poultry Science**, v. 86, p. 2541-2549, 2007.

APÊNDICE A

Modo de preparo do meio de cultura Bifidobacterium:

Os ingredientes e suas respectivas quantidades estão descritas na Tabela 19. Preparar a glicose separadamente. Dissolver os sais, acrescentar as proteínas em água aquecida a 40°C, adicionar o Tween 80, acertar o pH – 6,8 e autoclavar a 121°C por 15 min. Após a autoclavagem, acrescentar a glicose previamente autoclavada e as soluções de ácido ascórbico e L-cisteína (estas soluções não devem ser autoclavadas, apenas filtradas) a 45°C. Para preparar o caldo Bifidobacterium, basta não acrescentar o ingrediente ágar.

Tabela 19 - Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura Bifidobacterium – São Paulo – 2008/2009

Ingredientes	Quantidades
Casitone	10g
Extrato de carne	5g
Extrato de levedura	5g
Glicose	10g
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	3g
Tween 80	1 ml
Solução de ácido ascórbico	25 ml
Solução de L-cisteína - HCl	25 ml
Ágar	15g
Água estéril	1 L

Modo de preparo do meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion):

Os ingredientes e suas respectivas quantidades estão descritas na Tabela 20. Misturar os ingredientes e autoclavar a 121°C por 15 min. Para preparar o caldo BHI, basta não adicionar o ingrediente ágar.

Tabela 20 - Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) – São Paulo – 2008/2009

Ingredientes	Quantidades
BHI	37g
Ágar	15g
Água estéril	1L

Modo de preparo do meio de cultura m-Enterococcus:

Os ingredientes e suas respectivas quantidades estão descritas na Tabela 21. Misturar os ingredientes. Acertar pH 7,2 a 25°C. Fundir em banho-maria até dissolver completamente o meio.

Tabela 21 - Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura m-Enterococcus – São Paulo – 2008/2009

Ingredientes	Quantidades
Digerido pancreático de caseína	15g
Papaína digerida de soja	5g
Extrato de levedura	5g
Glicose	2g
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	4g
Azida sódica (NaN ₃)	0.4g
Cloreto de trifetil tetrazolium	0.1g
Ágar	10g
Água estéril	1L

Modo de preparo do meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe):

Os ingredientes e suas respectivas quantidades estão descritas na Tabela 22. Preparar a glicose separadamente. Dissolver os sais, acrescentar as proteínas em água aquecida a 40°C, adicionar o Tween 80, acertar o pH – 6,2 e autoclavar a 121°C por 15 min. Após a autoclavagem, acrescentar a glicose previamente autoclavada a 45°C. Para preparar o caldo MRS, basta não acrescentar o ingrediente ágar.

Tabela 22 - Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe) – São Paulo – 2008/2009

Ingredientes	Quantidades
Peptona	10g
Extrato de carne	8g
Extrato de levedura	4g
Glicose	20g
Fosfato de potássio (K_2HPO_4)	2g
Acetato de sódio ($3H_2O$)	5g
Citrato de amônio bibásico ($(NH_4)_2HC_6H_5O_7$)	2g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2g
Sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.038g
Tween 80	1 ml
Ágar	15g
Água estéril	1L

Modo de preparo do meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*):

Os ingredientes e suas respectivas quantidades estão descritas na Tabela 19. Misturar os ingredientes e autoclavar a 121°C por 15 min.

Tabela 23 - Ingredientes e quantidades para preparação do meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) – São Paulo – 2008/2009

Ingredientes	Quantidades
TSB	30g
Água estéril	1L