



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

RHABERSH SALES RODRIGUES PASCOAL

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Zymomonas mobilis*
Z1-96 UFPEDA 363 PARA USO NA AVICULTURA**

RECIFE
2024

RHABERSH SALES RODRIGUES PASCOAL

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Zymomonas mobilis*
Z1-96 UFPEDA 363 PARA USO NA AVICULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima Gomes

RECIFE

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Pascoal, Rhabersh Sales Rodrigues.

Caracterização do potencial probiótico de *Zymomonas mobilis* Z1-96
UFPEDA 363 para uso na avicultura / Rhabersh Sales Rodrigues Pascoal. -
Recife, 2024.

44 p. : il., tab.

Orientador(a): Gláucia Manoella de Souza Lima-Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Adesão celular. 2. Frangos de corte. 3. Trato gastrointestinal. 4. Probiótico.
I. Lima-Gomes, Gláucia Manoella de Souza . (Orientação). II. Título.

500 CDD (22.ed.)

RHABERSH SALES RODRIGUES PASCOAL

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Zymomonas mobilis*
Z1-96 UFPEDA 363 PARA USO NA AVICULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, do Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção de cumprimento a requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 24/07/2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^o.Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima Gomes
Universidade Federal de Pernambuco

MSc Ana Claudia Alcantara Lemos
Universidade Federal de Pernambuco

MSc Nínive Bezerra Florêncio
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, Marta Sales e Rosinaldo Pascoal, que sempre me apoiaram e me motivaram.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Rosinaldo Pascoal e Marta Sales, cujo apoio inabalável e presença constante foram pilares essenciais em todas as etapas desta jornada. Seja nas decisões difíceis ou nos momentos desafiadores, eles sempre estiveram ao meu lado, demonstrando um amor incondicional e acreditando no meu potencial para alcançar o grande objetivo da graduação em Ciências Biológicas. Esta conquista não é apenas minha, este diploma não pertence apenas a mim, mas também à minha mãe e ao meu pai.

Sou imensamente grata aos meus amigos que surgiram durante o curso Gabriel, M. Fernanda, Lucas Felix, Ramon Silva, Mirelle Araujo e Ariadne, que tornaram esta jornada mais leve e significativa. Seja através de conversas profundas, ajudando nos estudos, compartilhando momentos de descontração ou celebrando cada conquista, eles estiveram sempre presentes. Que possamos continuar compartilhando muitas outras etapas juntos.

No âmbito acadêmico, gostaria de expressar minha profunda gratidão a minha equipe, “Equipe Zymo”, composta pela Mestranda Nathali Santana e o estudante Gabriel Santos por terem contribuído de forma significativa para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Este trabalho é uma demonstração direta do impacto positivo de suas orientações e apoio. Fizemos do Departamento de Antibióticos, não apenas um local de estudo, mas de uma segunda casa, um espaço de aprendizado, crescimento e de momentos felizes. Agradeço por terem contribuído diretamente para a pessoa que me tornei hoje. Muito obrigada!

Não poderia deixar de mencionar uma pessoa muito especial, minha orientadora e amiga, Professora Dra. Gláucia Lima, sou grata pela oportunidade de me guiar nesta importante fase da minha formação acadêmica. Sua orientação e apoio foram fundamentais para o meu desenvolvimento como estudante e como pessoa. Obrigada por tudo! Por fim, agradeço também aos pós-graduandos e técnicos que compartilharam seus conhecimentos e experiências, preparando-me para enfrentar os desafios futuros como bióloga.

“I did, I've done everything that I wanted
and it was more than I thought it would be,
i will leave my mark so everyone will know
i was here.”

(Beyoncé)

RESUMO

A avicultura busca métodos eficazes e acessíveis para controlar infecções e promover o crescimento das aves. Os probióticos surgem como uma opção promissora, pois não causam resistência bacteriana e podem melhorar o ganho de peso em frangos de corte. *Zymomonas mobilis*, bactéria Gram negativa vem sendo estudada e observada quanto a sua característica probiótica. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar as características probióticas da cepa Z1-96 de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 363. Foram realizados testes de seguranças e de caracterização probiótica. A cinética de crescimento bacteriano apresentou crescimento exponencial entre o período de 0h (8,483 logs UFC/ ml) a 24h (8,8 log UFC/ml). A taxa de auto-agregação da cepa Z1-96 foi de 17%, 26% e 64% em 3, 5 e 24 horas de incubação. A capacidade de co-agregação entre *Z. mobilis* e *S. aureus*, *E.coli*, *S.enteritidis* foi de 64%, 53% e 49% em 24 horas, respectivamente. A cepa Z1-96 apresentou hidrofobicidade de 93,6% com o Clorofórmio, 85,2% com o acetato de etila e de 50,79% com o Xileno ,reforçando a capacidade de adesão celular pela cepa estudada. A análise de tolerância ácida demonstrou que a cepa Z1-96 foi capaz de sobreviver na variação de pH de 3, 3,5 e 7 com percentual de sobrevivência de 54%, 99% e 100%, respectivamente. Avaliou-se também a capacidade da cepa crescer em diferentes concentrações de sais biliares (1%, 0,5%, 0,3%, 0,1%) sendo evidenciado percentual de sobrevivência de 96% a 100%. Ao simular *in vitro* as condições do trato gastrointestinal, foi evidenciada a sobrevivência da cepa com viabilidade superior \log_{10} 8 UFC/mL. Foi evidenciada atividade antagônica frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414. A cepa Z1-96 apresenta-se como segura, sendo sensível aos antibióticos Tetraciclina (30 μ g), Azitromicina (15 μ g), Cefuroxima (30 μ g), Amicacina (30 μ g), Polimixina (300 μ g), Ampicilina (10 μ g), Aztreonam (30 μ g) e Penicilina (10 μ g). Não apresenta atividade hemolítica e ausência da enzima gelatinase. Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que a cepa da *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 apresenta-se como uma alternativa viável para uso probiótico na avicultura sendo capaz de sobreviver às condições do trato gastrointestinal mantendo-se viável. Esses resultados indicam que a cepa *Zymomonas mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 cresce bem em condições adversas, possui atividade antimicrobiana e boa adesão celular, porém mais estudos são necessários para atestar o caráter probiótico da bactéria.

Palavras-chave: Adesão celular, Frangos de corte, Trato gastrointestinal.

ABSTRACT

Poultry farming seeks effective and affordable methods to control infections and promote bird growth. Probiotics emerge as a promising option, as they do not cause bacterial resistance and can improve weight gain in broilers. *Zymomonas mobilis*, a Gram-negative bacterium, has been studied and observed for its probiotic characteristics. Given the above, this study aimed to evaluate the probiotic characteristics of the *Zymomonas mobilis* UFPEDA 363 strain Z1-96. Safety and probiotic characterization tests were performed. The bacterial growth kinetics showed exponential growth between the period 0h (8.483 log CFU/ml) and 24h (8.8 log CFU/ml). The self-aggregation rate of the Z1-96 strain was 17%, 26% and 64% at 3, 5 and 24 hours of incubation. The co-aggregation capacity between *Z. mobilis* and *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* was 64%, 53% and 49% in 24 hours, respectively. The Z1-96 strain presented hydrophobicity of 93.6% with chloroform, 85.2% with ethyl acetate and 50.79% with xylene, reinforcing the cell adhesion capacity of the studied strain. The acid tolerance analysis demonstrated that the Z1-96 strain was able to survive in the pH range of 3, 3.5 and 7 with survival percentages of 54%, 99% and 100%, respectively. The ability of the strain to grow in different concentrations of bile salts (1%, 0.5%, 0.3%, 0.1%) was also evaluated, with a survival percentage of 96% to 100%. When simulating in vitro the conditions of the gastrointestinal tract, the survival of the strain with viability superior to log₁₀ 8 CFU/mL was evidenced. Antagonistic activity against the microorganisms *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Escherichia coli* UFPEDA 224 and *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414 was evidenced. The Z1-96 strain appears to be safe, being sensitive to the antibiotics Tetracycline (30µg), Azithromycin (15µg), Cefuroxime (30µg), Amikacin (30µg), Polymyxin (300µg), Ampicillin (10µg), Aztreonam (30µg) and Penicillin (10µg). It does not present hemolytic activity and absence of the gelatinase enzyme. Therefore, the results obtained in this research demonstrate that the *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 strain presents itself as a viable alternative for probiotic use in poultry farming, being able to survive the conditions of the gastrointestinal tract while remaining viable. These results indicate that the *Zymomonas mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 strain grows well under adverse conditions, has antimicrobial activity and good cell adhesion, but further studies are needed to attest to the probiotic character of the bacteria.

Keywords: Cell adhesion, Broiler chickens, Gastrointestinal tract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Cinética de crescimento de <i>Z. mobilis</i> Z1-96 UFPEDA 363	26
Figura 2 -Percentual de auto-agregação e coagregação da cepa <i>Z.mobilis</i> Z1-96 frente a bactérias patogênicas.	28
Figura 3 -Análise de tolerância ácida de <i>Z. mobilis</i> Z1-96 UFPEDA 363	31
Figura 4 -Análise de tolerância ao sal biliar de <i>Z.mobilis</i> Z1-96 UFPEDA 363.	33
Figura 5 -Teste Simulado do Trato Gastrointestinal da cepa <i>Z. mobilis</i> Z1-96	34
Figura 6 -Teste de hemólise com a cepa <i>Z. mobilis</i> Z1-96	38
Figura 7 -Teste de gelatinase com a cepa <i>Z. mobilis</i> Z1-96 UFPEDA 363 e microrganismos testes.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Percentual de hidrofobicidade da cepa <i>Z. mobilis</i> Z1-96 com solventes.	30
Tabela 2 –	Atividade antagônica da cepa <i>Z. mobilis</i> Z1-96 frente a bactérias patogênicas.	36
Tabela 3 –	Antibióticos testes frentes a cepa <i>Z.mobilis</i> Z1-96.	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 AVICULTURA NA ECONOMIA BRASILEIRA	13
2.2 MICRORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES	14
2.2.1 ANTIBIÓTICOS NA AVICULTURA	16
2.2.2 PROBIÓTICOS NA AVICULTURA	17
2.3 <i>Zymomonas mobilis</i> COMO PROBIÓTICO	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	20
4.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	20
4.3.1 CAPACIDADE DE AUTO - AGREGAÇÃO E CO - AGREGAÇÃO	20
4.3.2 TESTES DE HIDROFOBICIDADE	21
4.3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA ÁCIDA	22
4.3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO SAL BILIAR	22
4.3.5 TESTE <i>in vitro</i> DE TOLERÂNCIA GASTROINTESTINAL	22
4.4 ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA CEPA DE <i>Z. mobilis</i>	23
4.5 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS DE SEGURANÇA	23
4.5.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	23
4.5.2 TESTE DE HEMÓLISE	24
4.5.3 TESTE DE GELATINASE	24
5 RESULTADOS	25
5.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	25
5.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	25
5.3.1 CAPACIDADE DE AUTO-AGREGAÇÃO E CO-AGREGAÇÃO	26
5.3.2 TESTE DE HIDROFOBICIDADE	28
5.3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA ÁCIDA	30
5.3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO SAL BILIAR	31
5.3.5 TESTE <i>in vitro</i> DE TOLERÂNCIA GASTROINTESTINAL	33
5.4 ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA CEPA DE <i>Z. mobilis</i>	34
5.5 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS DE SEGURANÇA	36
5.5.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	36
5.5.2 TESTE DE HEMÓLISE	37
5.5.3 TESTE DE GELATINASE	37
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Diante ao crescimento do consumo de carne de frango e alta demanda de produtividade, a indústria avícola tem aumentado cada vez mais os investimentos e tecnologias para melhorar o desempenho dos frangos de corte. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2023 foram produzidas mais de 14.8 milhões de toneladas de carne de frango, pela alta demanda é necessário usar um promotor de crescimento que também controle microrganismos patogênicos em animais. Assim obtendo a prevenção de infecções e doenças nas aves (Li, 2017; Manafi *et al.*, 2019).

Há um foco cada vez maior em melhorar o desempenho do ganho de peso para alcançar alta produtividade (Do nascimento; Balbinot 2020). Muitos fatores podem modificar o rendimento dos frangos de corte, como temperatura, qualidade da ração, manejo incorreto e uso de promotores de crescimento que agem diretamente na microbiota da ave afetando o desempenho. Como resultado desses fatores, os animais podem apresentar níveis significativos de estresse, como perda de penas, feridas e desequilíbrios na microbiota intestinal, que podem resultar na morte do animal ou uso de meios legais de eutanásia (Teng; Kim, 2018).

A utilização de antibióticos é uma prática comum na criação de frangos de corte, tanto como medida preventiva contra a infestação por *Salmonella* spp quanto como estimulante de crescimento. Contudo, devido às proibições e restrições impostas ao uso de antibióticos por determinados países, diante do aparecimento dos microrganismos resistentes, a demanda por alternativas que possam aprimorar a microbiota das aves está em constante ascensão (Pereira, 2012; Jha *et al.*, 2020; I. Ogbuewu *et al.*, 2022).

Devido a essa preocupação tem-se buscado alternativas naturais para manter a microbiota intestinal em equilíbrio sem causar danos à saúde. Dentre essas alternativas, os probióticos têm sido utilizados na nutrição animal por serem considerados aditivos que atuam de forma benéfica para o hospedeiro, auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas. Além de melhorar disfunções do sistema imunológico e influenciar o metabolismo intestinal e secreção de mucinas (Fuller, 1989; Jha *et al.*, 2020).

Um dos microrganismos que apresentam características probióticas são as bactérias denominadas *Zymomonas mobilis*, conhecidas pelo processo de

fermentação de vegetais, como o *Agave* sp. no México. Do qual se obtém uma bebida naturalmente fermentada denominada “aguamiel”, muito utilizada pelos astecas na prevenção e no tratamento de infecções intestinais (De Lima *et al.*, 1970).

Desde a década de 1950, vários pesquisadores do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco vêm desenvolvendo trabalhos com *Zymomonas mobilis* e, a partir desses estudos, foi sugerido o uso do seu fermentado como agente terapêutico contra várias infecções, como enterocolite e cistite, sendo obtida regressão dos sintomas em todos os casos (De Lima, 1975; Gomes, 1959).

A avicultura requer métodos mais práticos e tecnológicos, com baixo custo, para controlar a infecção nas aves, assim, promovendo o crescimento e a saúde dos animais. Portanto, o presente trabalho visa avaliar *in vitro* as características probióticas da cepa de *Zymomonas mobilis* Z1-96 para posterior utilização na promoção de saúde em frangos de corte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AVICULTURA NA ECONOMIA BRASILEIRA

Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de carne de frango, com 20% da produção global em 2016, e continuaram a crescer até 2023. Em 2023, o Brasil passou a ocupar a segunda posição na produção de carne de frango, com um volume próximo de 15 milhões de toneladas. Junto com os Estados Unidos, China e União Europeia, esses quatro produtores representam cerca de 60% da produção mundial (Embrapa, 2021; 2022; 2023).

A carne bovina e a suína foram as mais consumidas no mercado mundial durante os últimos 50 anos, possuindo o maior volume de produção. As carnes de aves ainda iniciavam a sua produção comercial. De modo que nos últimos 20 anos houve um aumento na produção da avicultura, tornando-se mundialmente uma das produções de maior qualidade (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018; Clavijo; Flórez, 2018;).

O Brasil, em 2016, enfrentou uma queda na produção em 2017/2018 (1,42%) devido a instabilidades causadas pela crise econômica, redirecionando a produção para o consumo interno. Em 2019, a exportação recuperou-se, aumentando 2,2

vezes o volume de carne de frango produzido, atingindo 32% em 2020 (Embrapa, 2019; 2020; 2021).

Em 2018, O consumo mundial de carne de frango cresceu e foi semelhante ao das carnes suínas. A queda na produção de carne suína em 2018 estimulou um aumento na produção de frangos, que se destacaram devido ao seu ciclo de crescimento mais curto em comparação com a carne bovina. Com o crescimento mundial na produção de frangos, análises indicam que essa produção deve superar a de carne suína nos próximos anos (Clavijo; Flórez, 2018; Embrapa, 2019; 2020; 2021; Mingmongkolchai; Panbangred, 2018).

Segundo a Embrapa (2023), em 2023 o Brasil bateu recorde tanto na produção como na exportação da carne de frango e a estimativa é que em 2024 o país baterá outro recorde.

Devido à ausência de gripe aviária e ao status sanitário seguro, o Brasil possui vantagens na produção de carne. Além de gerar receitas cambiais significativas e ser uma das principais fontes de renda para a agricultura, esse mercado tem sido crucial para o crescimento social e econômico do país (Clavijo; Flórez, 2018; Mingmongkolchai; Panbangred, 2018).

Para prevenir doenças infecciosas nos animais e reduzir os custos de mortalidade, melhoradores de desempenho, como antibióticos, foram amplamente utilizados. Nos últimos anos, os probióticos têm sido usados para melhorar o desempenho e o crescimento das aves, resultando em um aumento de até 8% no ganho de peso corporal em comparação com rações sem esses melhoradores (Gadde *et al.*, 2018).

2.2 MICRORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DAS AVES

O trato gastrointestinal das aves começa pela orofaringe, que abrange as áreas do bico e da faringe, devido à ausência de uma distinção clara entre essas partes. O esôfago vem a seguir, sendo responsável por armazenar e umedecer os alimentos, facilitando a ação enzimática subsequente. O estômago é dividido em diferentes seções: o inglúvio (papo) com pH 4.8, o proventrículo (estômago glandular) com pH 4.2, e o estômago mecânico (moela) com pH 3.5. O proventrículo produz enzimas para decompor os alimentos, enquanto a moela realiza a

degradação mecânica (Rutz *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2018; Da Costa *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020).

O intestino delgado, que possui pH 6, é responsável pela digestão e absorção dos nutrientes e é dividido em três partes: duodeno, jejuno e íleo. O duodeno ativa as enzimas digestivas, o jejuno é a parte mais longa onde o alimento passa antes de chegar ao íleo, onde a atividade enzimática é interrompida, facilitando a colonização bacteriana (Feye *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020; Rutz *et al.*, 2015).

O intestino grosso, composto pelo ceco (pH 6.3), cólon (pH 7) e cloaca, é responsável pela reabsorção de água e nutrientes, com sua microbiota digerindo celulose, polissacarídeos resistentes e amido (Costa *et al.*, 2017; Feye *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020; Rutz *et al.*, 2015). As cepas bacterianas desempenham um papel crucial na digestão, absorção de nutrientes, resposta imune e eficiência alimentar, formando uma barreira protetora nas paredes epiteliais e produzindo ácidos orgânicos, ácidos graxos e compostos antimicrobianos (Ding *et al.*, 2017; Shang *et al.*, 2018).

No papo, encontram-se *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterobacter*, enquanto no proventrículo e moela predominam *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Coliformes*. A composição da microbiota no trato digestivo dos frangos de corte também depende da alimentação oferecida. O crescimento bacteriano no intestino é reduzido pela presença de inibidores, mas gêneros como *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, além da família *Enterobacteriaceae*, são predominantes no intestino delgado. No íleo, *Lactobacillus* é mais comum, seguido por *Clostridium*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. No ceco, os filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são predominantes (Shang *et al.*, 2018).

Apesar da ampla microbiota presente no trato gastrointestinal (TGI) das aves, a maioria não é patogênica. No entanto, sob certas condições, alguns microrganismos podem se comportar como patógenos oportunistas, sendo transmitidos pelos alimentos e apresentando risco à saúde humana (El jeni *et al.*, 2021). Saliendo que fatores como idade, sexo, dieta alimentar, aditivos na alimentação, presença de antibióticos ou administração, meio externo e fatores ambientais que podem mudar a composições da microbiota intestinal das aves. (Ding *et al.*, 2017; El jeni *et al.*, 2021).

2.2.1 ANTIBIÓTICOS NA AVICULTURA

A partir de 1950, os antibióticos começaram a ser integrados na ração animal como promotores de crescimento antimicrobiano (AGPs), tais como virginiamicina ou dissalicilato de metileno bacitracina utilizados em concentrações subterapêuticas, auxiliando significativamente no crescimento da indústria avícola ao longo dos últimos 50 anos para prevenir doenças nas aves (Gadde *et al.*, 2018; Mehdi *et al.*, 2019; Vieco-saiz *et al.*, 2019).

Os antibióticos usados na avicultura para controle microbiológico e promoção de crescimento se dividem em vários grupos, como Aminoglicosídeos, Cefalosporinas de cinco gerações, Glicopeptídeos, Macrolídeos, Penicilinas, Quinolonas e Sulfonamidas. Na América do Norte, os mais comuns são tetraciclina, bacitracina, tilosina, salinomicina, virginiamicina e bambermicina (Adzitey, 2015; Mehdi *et al.*, 2019).

Os antibióticos proporcionam um ambiente intestinal controlado, crucial para prevenir o surgimento de doenças e patógenos, promovendo um crescimento mais eficiente, rápido e melhor absorção alimentar, além de reduzir a mortalidade dos animais, tornando-os mais adequados para o mercado (Low *et al.* 2021; Mehdi *et al.* 2019).

No entanto, o uso excessivo de antibióticos levantou preocupações com o desenvolvimento de cepas microbianas resistentes, como *Escherichia coli* resistente a ampicilina, cefalosporinas de primeira geração, sulfonamidas, ácido nalidíxico e tetraciclina; *Salmonella sp.* resistente a cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas; *Campylobacter* resistente a fluoroquinolonas e macrolídeos, e *Escherichia coli* resistente a ampicilina e tetraciclina, que podem se disseminar globalmente (Davis *et al.*, 2018; Mäesaar *et al.*, 2018; Pesciaroli *et al.*, 2020).

Essas cepas resistentes têm impactos negativos na saúde, no desempenho reprodutivo e de crescimento dos animais, além de representar uma ameaça à saúde humana devido à presença de resíduos de drogas na carne dos animais, que podem causar desde alergias até efeitos cancerígenos em humanos (Mehdi *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; Vieco-saiz *et al.*, 2019).

Em resposta a essas preocupações, em 2015, a Assembleia Mundial da Saúde endossou um Plano de Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos, enquanto a Comissão Europeia adotou legislação proibindo o uso de todos os

antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal, refletindo um esforço global para mitigar os riscos associados ao uso indiscriminado de antibióticos na produção de alimentos (Chen *et al.*, 2020; Mandal *et al.*, 2021).

2.2.2 PROBIÓTICOS NA AVICULTURA

Probióticos são suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, inofensivos, capazes de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal dos consumidores. Eles regulam a população de microrganismos patogênicos, promovendo um trato digestivo saudável e estimulando as respostas imunológicas do hospedeiro (Zaghari; Sarani; Hajati, 2020; Ramlucken *et al.*, 2020).

Os probióticos comerciais são desenvolvidos com cepas bacterianas reconhecidas por seu potencial probiótico, como *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Eles melhoram o estado imunológico, a eficiência alimentar em aves e controlam o crescimento de bactérias patogênicas como *Campylobacter coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis* (Zaghari *et al.*, 2020; Ramlucken *et al.*, 2020).

Em resposta às restrições ao uso de antibióticos, os probióticos começaram a ser usados como promotores de crescimento e para melhorar as condições de desenvolvimento animal. Alguns probióticos comerciais, como Lavipan, substituem os antibióticos, demonstrando eficácia contra *Campylobacter spp.*, reduzindo sua prevalência no trato gastrointestinal e nas carcaças após o processamento (Smialek *et al.*, 2018).

2.3 *Zymomonas mobilis* COMO PROBIÓTICO

Zymomonas mobilis é uma bactéria gram-negativa, flagelada, anaeróbica facultativa, não esporulante, com colônias brancas de bordas irregulares, em bastonetes de 2-6 µm de comprimento e 1-1,5 µm de largura. Utiliza exclusivamente a via Entner-Doudoroff (ED) para metabolizar carboidratos como glicose, sacarose e frutose, sendo uma fonte de carbono para crescimento, produção de etanol, levana e frutooligossacarídeos (FOS). Além disso, absorve açúcares mais rapidamente que outras bactérias, apresenta alta tolerância ao álcool e uma ampla faixa de pH

(3,5-7,5), sendo considerada segura para consumo humano e animal (GRAS) (Swings e de Ley, 1977; De Araújo *et al.*, 2018).

Z. mobilis ocorre naturalmente em fermentados vegetais, sendo isolada pela primeira vez no suco de maçã fermentado, conhecido como "doença da cidra". Também foi isolada de fermentados como pêra na Europa, seivas de plantas na África, Ásia e Américas, e na deterioração de cervejas nas Ilhas Britânicas, além de uma bebida mexicana produzida pela seiva de plantas *Agave sp.* (Campos *et al.*, 2013; Magalhães, 2016).

Em Pernambuco, no início do século XX, o pesquisador Gonçalves de Lima isolou cepas altamente produtivas de etanol de *Z. mobilis* de caldo de cana-de-açúcar. Desde então, esses isolados são mantidos na Coleção de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) (De Araújo *et al.*, 2018).

Em 1924, o pesquisador Lindner relatou pela primeira vez a atividade antimicrobiana de *Zymomonas* contra *cocos piogênicos* e bactérias entéricas. Na mesma época, médicos do Recife utilizaram caldo fermentado de *Zymomonas* para tratar doenças crônicas entéricas e vaginais, conseguindo eliminar sintomas clínicos de infecções associadas a microrganismos resistentes como *Proteus morgani*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella enteritidis* (De Araújo *et al.*, 2018; Mesquita, 2008).

Estudos têm explorado as características probióticas de algumas cepas de *Zymomonas mobilis*. Pesquisas mostram que suas cepas produzem ácido láctico e acético, reduzindo o pH e inibindo o crescimento de micróbios patogênicos. Ela também produz bacteriocinas e peptídeos bacterianos complexos com atividade bacteriostática e bactericida, e apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. Além disso, regula o trato digestivo humano, resistindo à bile e enzimas biliares devido à produção de hopanoides, polissacarídeos e exopolissacarídeos (Lima *et al.*, 2011; Pallach *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020).

Embora existam alguns estudos *in vitro* sobre as características probióticas de *Z. mobilis*, também são necessários estudos *in vivo* para confirmar seu potencial em promover a saúde animal e humana, melhorando o desempenho imunológico e controle de infecções gastrointestinais (De Azerêdo *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial probiótico *in vitro* e aspectos de segurança de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 363.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a cinética de crescimento da linhagem de *Z. mobilis* UFPEDA 363;
- Avaliar as características probiótica *in vitro* da linhagem de *Z. mobilis* UFPEDA 363;
- Analisar a atividade antagônica da linhagem de *Z. mobilis* UFPEDA 363;
- Realizar aspectos de segurança como hemolisina e gelatinase *in vitro* da linhagem de *Z. mobilis* UFPEDA 363;

4 METODOLOGIA

4.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O isolado de *Zymomonas mobilis* Z1-96 UFPEDA 363, preservado na Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA), pertencente a Universidade Federal de Pernambuco foi reativado em meio líquido padrão SSDL (extrato de levedura 5 g, glicose 20 g, água destilada 1000mL), incubado a 30° por 48h (Swings e de Ley, 1977).

Após o período de incubação, foram feitos repiques em Ágar SSDL e em Ágar Nutriente (AN) para a verificação do crescimento e possíveis contaminações. As cepas patogênicas utilizadas para posteriores testes foram *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414 e *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 foram reativadas em meio AN à 37°C por 24h.

4.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Para análise da cinética de crescimento da cepa de *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363, foi cultivada em caldo SSDL a 30°C por 48 horas. Posteriormente, foi retirada uma amostra de 1 mL do pré-inóculo (10^8 UFC/mL) e inoculado em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio SSDL. Esse inóculo foi incubado a 30°C por 48 horas, obtendo a concentração de 10% (10^8 UFC/ml).

Para acompanhar a cinética de crescimento da cepa, alíquotas de um mililitro foram retiradas em intervalos de 3 horas durante 48 horas, seguindo para diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), às diluições foram feitas em tubos e o plaqueamento em meio agar SSDL com o auxílio da alça de Drigalski. Por fim, o número de células viáveis e a cinética de crescimento foram estimadas pela contagem de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) (Santana *et al.*, 2022).

4.3 TESTES DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS

4.3.1 CAPACIDADE DE AUTO - AGREGAÇÃO E CO - AGREGAÇÃO

Células da cepa Z 1-96 obtidas por centrifugação (5000 g x 10 min) da cultura recém ativada, lavadas duas vezes com tampão PBS (pH 7,2) e ressuspendidas no mesmo tampão foram homogeneizadas e a absorbância foi aferida a 625nm (At_0). Em seguida, 2 mL da suspensão foram mantidas à temperatura ambiente por 3, 5 e 24

horas, sendo retirado o sobrenadante para aferição da absorbância (A_{T_s}) (Scillato *et al.*, 2020).

No resultado de auto-agregação quando maior que 40%, demonstra forte agregação, moderada entre 10% e 40%; e, menor que 10%, demonstra um fraco poder de auto-agregação (WANG *et al.*, 2010). O cálculo das porcentagens de auto-agregação seguirá a fórmula:

$$\text{Auto-agregação: } A\% = 1 - (A_{T_s} / A_{t_0}) \times 100$$

Onde A_{T_s} representa a absorbância da amostra da cepa *Z.mobilis* nos tempos 3, 5 e 24 horas e A_{t_0} representa a absorbância da hora 0.

Para a avaliação da co-agregação, utilizou-se a mesma metodologia de auto-agregação e utilizamos as bactérias *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414 , *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, previamente cultivadas que foram misturada com a suspensão da linhagem de *Zymomonas mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 e aferida a absorbância em 625nm (OD_{TOT}). A mistura de probiótico/patógeno foi mantida em temperatura ambiente durante 24h e novamente foram retirado o sobrenadante para aferir a absorbância medida (OD_s) às 3, 5 e 24 horas, sendo calculada a taxa de co-agregação (Scillato *et al.*, 2020). O cálculo das porcentagens de auto-agregação seguirá a fórmula:

$$\text{Co-agregação: } CoA\% = OD_{TOT} - OD_s / OD_{TOT} \times 100$$

Onde OD_{TOT} representa a absorbância das amostras da cepa *Z.mobilis* e das bactérias patogênicas no tempo 0 e OD_s representa a absorbância das horas 3, 5 e 24 horas.

4.3.2 TESTES DE HIDROFOBICIDADE

O grau de hidrofobicidade da cepa Z1-96 foi determinado pelo método descrito por Lee *et al.*, (2016), baseado na adesão das células aos solventes orgânicos, Xileno (solvente apolar), clorofórmio (solvente ácido), e acetato de etila (solvente básico). A cultura foi cultivada em 10 mL de SSDL líquido, centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min para a separação das células. O sedimento foi lavado duas vezes e ressuspendido em 10 mL de solução PBS e a absorbância desta fase (A_0) foi medida a 625 nm. A suspensão celular foi então misturada 2 mL da suspensão com 2mL de

cada solvente, homogeneizados, e, em seguida, mantida por 3h para completa separação em duas fases: orgânica e aquosa. A absorbância da fase aquosa foi aferida (A_T), o percentual de hidrofobicidade foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = (1 - A_T / A_o) \times 100$$

Onde A_T representa a absorbância da fase aquosa da cepa *Z.mobilis* mais os solventes e A_o é o sedimento lavado duas vezes e ressuspendido em 10 mL de solução PBS e a absorbância aferida no mesmo momento.

4.3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA ÁCIDA

Para avaliar a tolerância ácida, a cepa Z1-96 UFPEDA 363 foi cultivada em caldo SSDL durante 24h e, após esse período, foi retirado um volume correspondente a 10% do pré-inóculo que foi inoculado em tubos de ensaio contendo 9 mL meio SSDL com pH ajustado para: 2; 2,5, 3, 3,5 e 7, incubados a 30°C. Alíquotas de um mililitro foram retiradas após 1, 2, 3 e 4h de inoculação, seguindo para diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}). Posteriormente, as amostras foram inoculadas em placas de ágar SSDL com o auxílio da alça de Drigalski e incubadas a 30°C por 48 horas. Finalmente, o número de células viáveis foi estimado pela contagem de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) (Mesquita 2008).

4.3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO SAL BILIAR

Em relação aos testes de tolerância ao sal biliar, a cepa foi cultivada em caldo SSDL durante 24h, e, após esse tempo, foi retirado um volume de 10% do pré-inóculo e foi inoculado em tubos de ensaio contendo meio SSDL com 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1% (p/v) de sal de bile e incubado a 30°C. Alíquotas de um mililitro foram retiradas após 1, 2, 3 e 4h de inoculação, seguindo para diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}). Posteriormente, as amostras foram inoculadas em placas de ágar SSDL com o auxílio da alça de Drigalski e incubadas a 30°C por 48 horas. Após esse tempo, o número de células viáveis foi estimado pela contagem de unidades formadoras de colônias por ml (UFC/mL) (Mesquita 2008).

4.3.5 TESTE *in vitro* DE TOLERÂNCIA GASTROINTESTINAL

O preparo dos sucos gástrico e intestinal simulados seguiu o descrito por

Farias *et al.*, (2017), com necessárias modificações. Uma alíquota de 1 mL de células livres foi adicionado em tubos com fluido gástrico simulados (9 g/L de NaCl, 3 g/L de pepsina, pH 3,0) e incubados por 120 minutos a 30 °C. Em seguida, foram submetidas ao FI (6,5g/L de NaCl, 0,22 g/L de CaCL₂, 1,0386 g/L de NaHCO₃, 0,22 g/L de KCL, 1 g/L de pancreatina e 3 g/L de sais biliares, pH 6,8), incubados por 180 minutos a 30 °C. As alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 60 e 120 min para FG e 0, 90 e 180 min para FI. Para finalizar, 100 uL de cada amostra foram inoculados em Ágar SSDL para contagem das células viáveis. As colônias foram contadas após 48h de crescimento na BOD e os resultados expressos em UFC/mL para células livres.

4.4 ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA CEPA DE *Z. mobilis*

A linhagem de *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 foi cultivada em caldo SSDL a 30°C por 48 horas, posteriormente, 10µL (10⁸ UFC/mL) deste fermentado foram inoculados em quatro pontos na placa de Petri contendo ágar SSDL e incubada a 30°C durante 48 horas. Em seguida, 10 mL de meio Ágar Müeller-Hinton semi-sólido contendo 10⁷ UFC/mL de cada microrganismo teste *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e 10 mL de Ágar Sabouraud semi-sólido contendo 10⁷ UFC/mL de *Candida albicans* UFPEDA 1007, *Candida guilliermondii* UFPEDA 6364 foram vertidos sobre a placa. Após a solidificação a placa foi incubada a 37°C com a leitura realizada em 24 horas. O antagonismo foi observado pela formação de um halo de inibição ao redor de cada colônia de *Z. mobilis* (Swings e de Ley, 1977).

4.5 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS DE SEGURANÇA

4.5.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Para análise de resistência a antibióticos, foi utilizada a metodologia modificada de Lima *et al.*, (2011). Foram preparadas suspensões em solução salina contendo 10⁸ UFC/mL da linhagem de *Z. mobilis* Z 1-96. Foram inoculadas 100uL das suspensões em placas de petri com o meio ágar SSDL pelo método de espalhamento, com o auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas 30°C por 42h. A estas placas, foram adicionados discos de papéis dos diferentes antibióticos (Amikacina 30 ug, Ampicilina 10 ug, Azitromicina 15 ug, Aztreonam 30 ug, Cefuroxima 30 ug, Ciprofloxacina 05 ug,

Penicilina 10 g, Polimixina 300 ug e Tetraciclina 30 ug). Após o tempo de incubação, foi realizada a análise da presença ou ausência e os diâmetros dos halos de inibição (Swings e de Ley., 1977).

4.5.2 TESTE DE HEMÓLISE

Para o teste de hemólise a cepa de *Z. mobilis* Z1-96 foi cultivada em meio caldo SSDL por 18 horas a 30°C. Posteriormente, o microrganismo foi repicado em uma placa de Petri, contendo 10 mL de meio Ágar Sangue, e incubado a 30°C por 48 horas. A análise foi realizada verificando a presença ou ausência de hemólise do sangue pela virada de cor do meio na placa. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 (Alves, 2003).

4.5.3 TESTE DE GELATINASE

O teste de gelatinase foi determinado em meio SSDL contendo gelatina (5% de extrato de levedura, 12% de glicose e 15% de gelatina). O isolado Z1-96 foi ativado anteriormente, transferido para tubos contendo o meio de cultura, incubado a 30 °C por cinco dias e mantido por 20 minutos em refrigeração. Como controle positivo utilizou-se *S. aureus* e negativo *E. coli*. Para leitura dos resultados, foi observado o estado físico do meio, sendo considerados como resultados positivos, os tubos que após a refrigeração permaneceram no estado líquido, confirmando a presença da enzima gelatinase (Pereira *et al.*, 2009).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados por meio dos parâmetros estatísticos (Desvio padrão, intervalo de confiança), análise de variância (ANOVA), comparação de médias por Tukey ao nível de 5% de confiabilidade, com uso dos softwares Origin for Windows 11, Paired Comparison Plot versão 3.7 e Past versão 4.03.

5 RESULTADOS

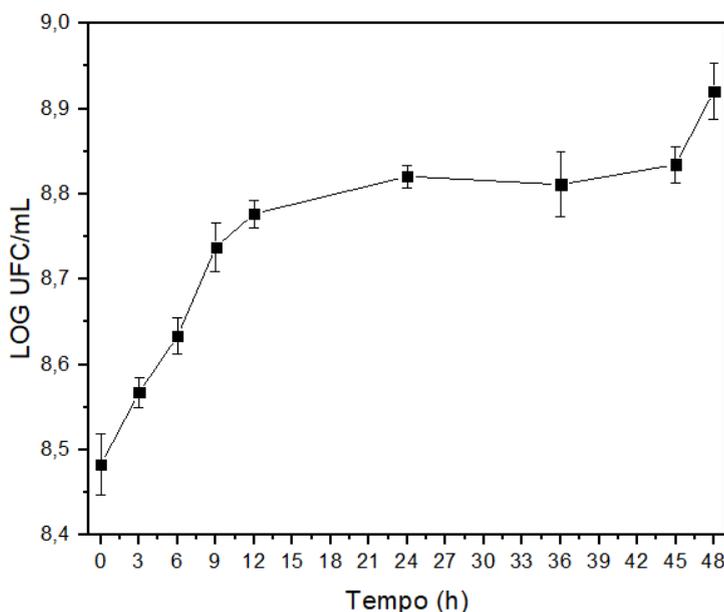
5.1 REATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A cepa Z1-96 UFPEDA 363 reativada em meio SSDL apresentou um excelente crescimento no meio SSDL, e ausência de contaminação em seu processo de reativação, analisada no meio Agar nutriente.

5.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A Figura 1 apresenta os valores médios (Log UFC/mL) do crescimento da cepa *Z. mobilis* Z1-96 ao longo de 48h de estudo cinético do inóculo.

Figura 1 - Cinética de crescimento de *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 em Log 10 UFC/mL



Fonte: Autora, 2024.

Por meio da contagem de unidades formadoras de colônias por mL em (Log UFC/mL), a cepa *Zymomonas mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 apresentou crescimento exponencial chegando a $8,8 \pm 0,01$ log UFC/mL após 24h de estudo cinético do inóculo. Essa cepa permaneceu na fase estacionária das 24h às 42h, permanecendo em $8,7 \pm 0,01$ log UFC/mL, não atingindo a sua fase de morte durante 48h de teste

(Figura 1), Segundo Lima *et al.* (2011), a *Zymomonas mobilis* produz metabólitos secundários, como bacteriocinas e alguns ácidos. O aumento observado após 45 horas pode ser decorrente do consumo desses metabólitos.

A linhagem de *Zymomonas mobilis* Z1-96 apresentou comportamento semelhante ao observado por Dai (2022), para o crescimento de *Lactobacillus plantarum* C010 (espécie comumente utilizada para a produção de probióticos), com crescimento exponencial iniciado após 2 horas de inoculação, onde atingiu sua estabilidade às 12 horas de cultivo, assim como foi observado nas nossas análises. Segundo o estudo realizado por Santana *et al.* (2022), onde a linhagem de *Z. mobilis* AG-11 apresentou crescimento exponencial dentro de 0 a 15 horas e permaneceu na fase estacionária no período de 24h a 42h, aproximando as nossas análises.

5.3 TESTES DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS

5.3.1 CAPACIDADE DE AUTO-AGREGAÇÃO E CO-AGREGAÇÃO

A taxa de auto-agregação da cepa Z1-96 foi de 17%, 26% e 64% para 3, 5 e 24 horas de incubação, respectivamente, sendo considerado moderado às 5 horas do teste, possuindo um alto poder de agregação após 24 horas. De modo geral, em todos os tempos foi evidenciada a capacidade de *Z. mobilis* interagir entre si, sendo observado um forte poder de auto agregação às 24h (Figura 2).

Vários estudos envolvendo esse tipo de avaliação apresentaram valores condizentes ao encontrados em nosso estudo. Neste sentido, pode ser destacado o estudo de Redondo *et al.* (2008), com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 que obtiveram ao final de seu experimento um percentual de auto-agregação de 79% e 80%, respectivamente, às 5 horas de experimento.

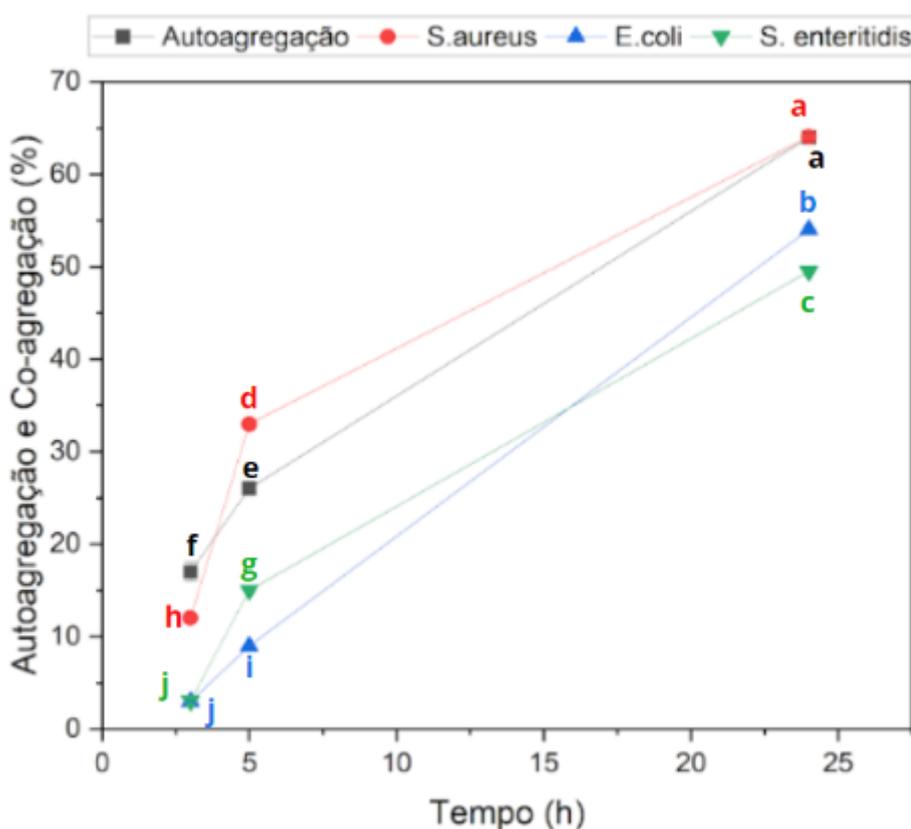
A auto-agregação pode ser influenciada por diferentes fatores, entre os quais destaca-se estratégias celulares, que permitam aumentar sua sobrevivência e reprodução, a interação entre adesinas e receptores celulares que contribuem para facilitar o processo de adaptação ao ambiente. A capacidade de se auto-agregar e características de hidrofobicidade são características importantes de uma célula probiótica (Khojah *et al.*, 2022).

O potencial celular de auto-agregação e co-agregação bacteriana é importante para evitar a colonização de microrganismos patogênicos. A auto-agregação e a co-agregação bacteriana são fundamentais para evitar que microrganismos

patogênicos se instalem. Esses processos ajudam a formar barreiras físicas, ocupar espaços, produzir substâncias que inibem os patógenos e criar um ambiente hostil para eles (Tareb *et al.*, 2013). Como resultado, essa interação com bactérias probióticas, como a *Z. mobilis* Z1-96, promovem a saúde intestinal, fortalece o sistema imunológico e ajudam a prevenir doenças nas aves.

No presente estudo foi possível observar uma maior taxa de co-agregação entre *Z. mobilis* e bactérias patogênicas sendo elas, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414 e *Escherichia coli* UFPEDA 224. A maior taxa de co-agregação foi observada após 5h, indo até 24h de incubação, obtendo uma taxa de 64%, 49% e 53% respectivamente, as 24 horas (Figura 2).

Figura 2 - Percentual de auto-agregação e coagregação da cepa *Z.mobilis* Z1-96 frente a bactérias patogênicas.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Comparação da capacidade de auto-agregação de cepa Z1-96 (■); coagregação da Z1-96 + *S.aureus* (●); coagregação da Z1-96 + *E.coli* (▲); coagregação da Z1-96 + *S.enteritidis* (▼).As barras de erro representam desvios-padrão dos valores médios dos resultados de três experimentos replicados.

As análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa

apenas às 24h quando comparamos a auto-agregação da cepa e a coagregação frente a *S.aureus*, ademais amostras apresentaram diferença significativa.

Esses resultados são de grande importância na caracterização da capacidade probiótica, pois leva a formação de uma barreira frente à colonização intestinal por patógenos (Reid *et al.*, 1988).

Em comparação a literatura, podemos observar que nas primeiras 5 horas de ensaio ocorreu um percentual de coagregação de 33% frente a *S. aureus*, resultado considerado superior aos encontrados em outros estudos, como Redondo *et al.*, (2008) e Kós *et al.*, (2003), que obtiveram uma coagregação entre *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416, *Lactobacillus acidophilus* M92 e *Enterococcus faecium* L3 de, aproximadamente, 25,4% e 19,46% respectivamente às 5h. Essa comparação é feita por testes realizados com bactérias já consideradas probióticas frente a bactérias patogênicas, assim através das nossas análises observamos que a Z1-96 possui uma maior capacidade de se co-agregar, se comparada com essas cepas.

A co-agregação refere-se à capacidade de alcançar uma massa apropriada ao co-agregar-se com outras espécies bacterianas, como relatado por Scillato *et al.* (2020). Quando as células se agrupam espontaneamente e coexistem, elas formam comunidades microbianas mais resistentes e duradouras, sendo capazes de secretar substâncias antagônicas, conseguindo evitar a proliferação de microrganismos patogênicos (Aslam *et al.*, 2018).

Esse processo pode oferecer vantagens, tais como, defesa contra estresses ambientais, resistência a agentes patogênicos e é aprimorada a capacidade de aderência a superfícies. Essas propriedades estão diretamente relacionadas à características probióticas. A habilidade de se agrupar e coexistir pode ampliar a eficácia dos probióticos ao colonizar o trato gastrointestinal e competir com microrganismos patogênicos (Daniali *et al.*, 2020).

5.3.2 TESTE DE HIDROFOBICIDADE

A cepa Z1-96 mostrou uma hidrofobicidade maior com o clorofórmio (93,6%) quando comparado com o acetato de etila (85,2%) e para o xileno (50,79%) (Tabela 1). Os testes com clorofórmio e acetato de etila indicam as características doador de elétrons (básico) e aceitador (ácido) da superfície celular, já com o uso do xileno

indicou a adesão bacteriana a hidrocarbonetos (Bellon-Fontaine, Rault; Van Oss, 1996).

Tabela 1 - Percentual de hidrofobicidade da cepa *Z. mobilis* Z1-96 com solventes.

Solventes	Hidrofobicidade (%)
Clorofórmio	93,5% ± 0,08
Acetato de etila	85,2% ± 0,02
Xileno	50,79% ± 0,04

Legenda: Média (\pm desvio-padrão) dos resultados de três experimentos separados.

Fonte: Autora, 2024

O desvio padrão variou entre 0,02 a 0,08.

Quando comparado com Lee *et al* 2016, que trabalhou com a cepa de *Bacillus* isoladas de milho de soja, especificamente a cepa *MKSK-J1*, obteve 88,2% para Clorofórmio, 21,5% para Acetato de etila e 28,1% para xileno. Podemos observar que a cepa *Z1-96* possui uma maior capacidade de adesão a hidrocarbonetos, e um maior doador de elétrons e aceitador da superfície celular.

Os solventes clorofórmio, acetato de etila e xileno são utilizados no teste de hidrofobicidade devido às suas propriedades químicas e capacidade de interagir com superfícies bacterianas, dissolvendo lipídios e outros compostos hidrofóbicos. Esses solventes fornecem informações sobre a quantidade de grupos hidrofóbicos nas superfícies celulares, indicando a adesão bacteriana e suas propriedades de virulência. A adesão bacteriana influencia a capacidade de colonização no trato gastrointestinal, conferindo vantagem competitiva no ecossistema (Alander *et al.*, 1997; Freter, 1992; Pedersen e Tannock, 1989).

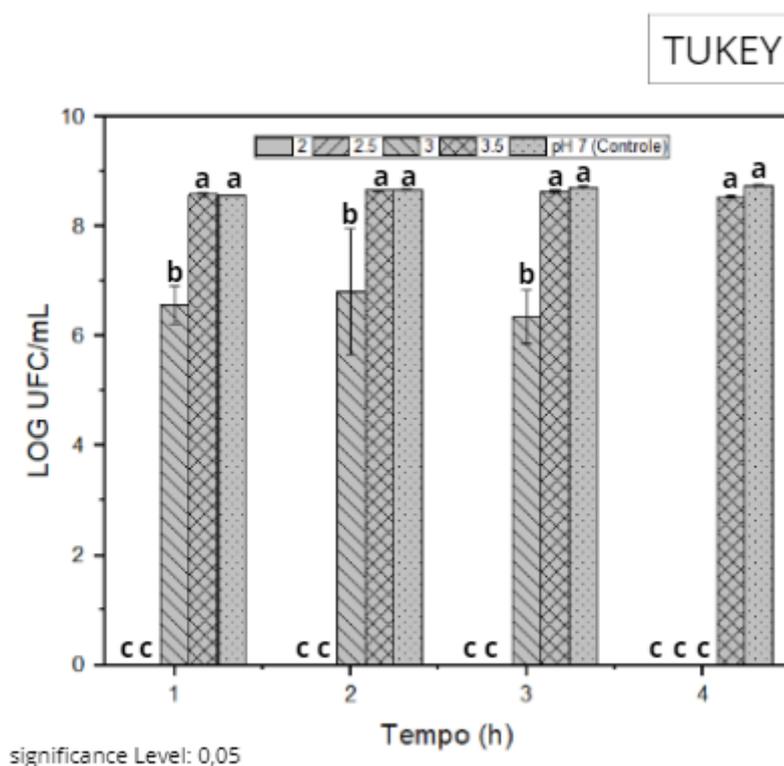
O isolado Z1-96 demonstrou uma notável percentagem de hidrofobicidade, os testes com clorofórmio e acetato de etila indicaram que a cepa tem uma alta característica de ser doadora de elétrons (básico) e aceitadora (ácido) da superfície celular, já com o xileno indicou ter adesão bacteriana a hidrocarbonetos como demonstrado na tabela 1. Assim, os resultados mostraram que a cepa *Z1-96* de *Zymomonas mobilis* tem alta hidrofobicidade celular, indicando atividade de adesão celular.

A alta taxa da hidrofobicidade resulta na colonização nos tecidos, microrganismos probióticos podem impedir o acesso de agentes patogênicos através de interações estéricas ou bloqueio específico de receptores celulares (Otero, Ocana e Macias, 2004).

5.3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA ÁCIDA

A análise de tolerância ácida demonstrou que a cepa *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 sobreviveu em pH 3, até 3 horas de teste, com média de 6,291 UFC/ml (Figura 3). Houve um bom crescimento no pH 3,5 e no controle com pH 7, com média de 8,60 UFC/ml e 8,6813 UFC/mL, respectivamente. Com relação ao pH 2 e 2,5, foi observada ausência de crescimento nas 4 horas de experimento, demonstrando que os mesmos não sobreviveram a esse pH ácido.

Figura 3 - Análise de tolerância ácida de *Z. mobilis* Z1-96 UFPEDA 363.



Legenda: Medidas com "a" nas mesmas linha não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$); b e c Médias com linha para grupos diferentes apresentam diferença significativa ($P > 0,05$);

Calculado por ANOVA unidirecional.

Fonte: Autora, 2024.

Como observado na imagem não houve diferença significativa entre o pH 3,5 e o pH 7 (controle), mas houve diferença significativa quando comparado aos demais pH.

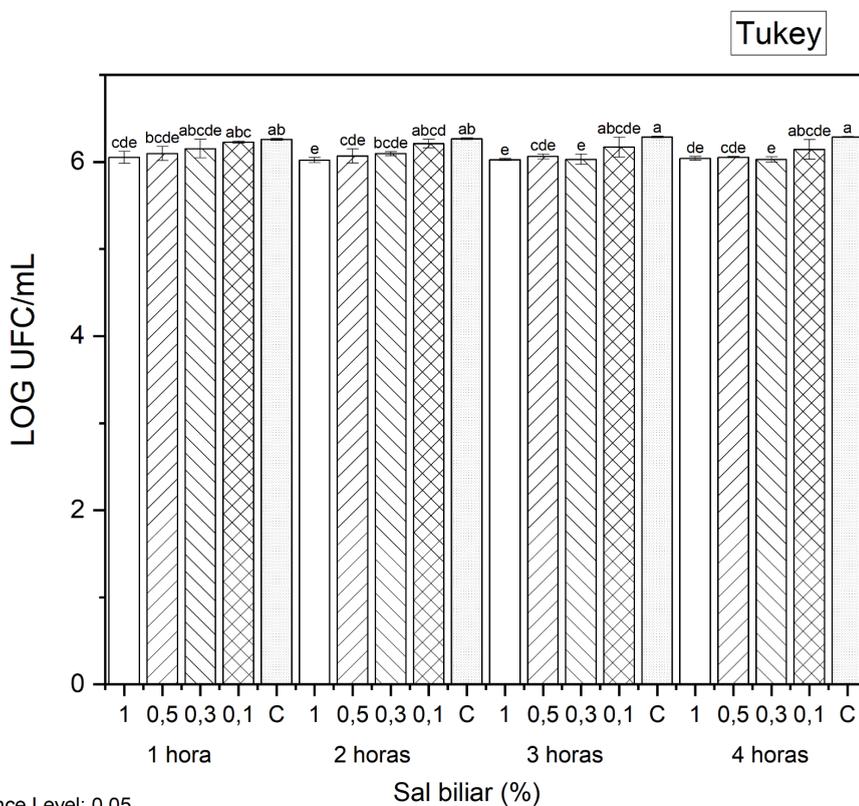
Em comparação ao estudo de Mesquita (2008), a cepa *Z. mobilis* UFPEDA 355 apresentou sensibilidade em meio SSDL com o pH 2,0, porém tolerante ao meio SSDL nos pH 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 com 5,42; 8,62; 9,38; 9,45 UFC/mL, respectivamente. Demonstrando que, mesmo sendo do mesmo gênero, possuem características e resistências diferentes por serem subespécies diferentes.

Avaliar a tolerância ácida é crucial para assegurar que probióticos e outros aditivos sejam eficazes após a ingestão. No caso das aves, que possuem um ambiente gástrico ácido com um pH entre 2,8 a 4, esse teste é essencial para garantir que as formulações nutricionais sejam adequadas às suas necessidades específicas, promovendo assim uma melhor saúde e desempenho. A cepa *Z. mobilis* Z1-96 demonstrou ser eficaz pois tolerou a acidez a partir do pH 3.

5.3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA AO SAL BILIAR

A análise de tolerância ao sal biliar demonstrou que a cepa *Z. mobilis* Z 1-96 UFPEDA 363 foi capaz de sobreviver à variação de sal biliar de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1%. Foi observado crescimento em todos os horários, demonstrando pequenas alterações com diferença significativa apenas para a concentração de 1% de sal biliar ao decorrer do tempo nas demais concentrações de sal biliar, com média de 6,19; 6,06; 6,06; 6,02. UFC/ml, respectivamente, com controle de 6,27 log UFC/ml. Assim não demonstrando interferência no crescimento da cepa Z1-96, independente da concentração de sal biliar, sobrevivendo às 4 horas de teste (Figura 4).

Figura 4 - Análise de tolerância ao sal biliar de *Z.mobilis* Z1-96 UFPEDA 363.



Legenda: Medidas com "a,b,c,d,e" com as mesmas letras na mesma linha não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$); e, cde Médias para grupos diferentes apresentam diferença significativa ($P > 0,05$);

Calculado por ANOVA unidirecional.

Fonte: Autora, 2024.

A análise estatística revelou que houve diferença significativa apenas quando comparado a concentração de 1% de sal biliar com o controle, mesmo assim, essa diferença foi de menos de 0,28 log UFC/mL.

Sendo observado um comportamento similar por Santana *et al.* (2022), e por Swings & De Ley (1977), com sobrevivência acima de 50% na concentração de 1% de sal biliar. Isso sugere que essa bactéria possui mecanismos adaptativos para lidar com a presença desses compostos no trato gastrointestinal.

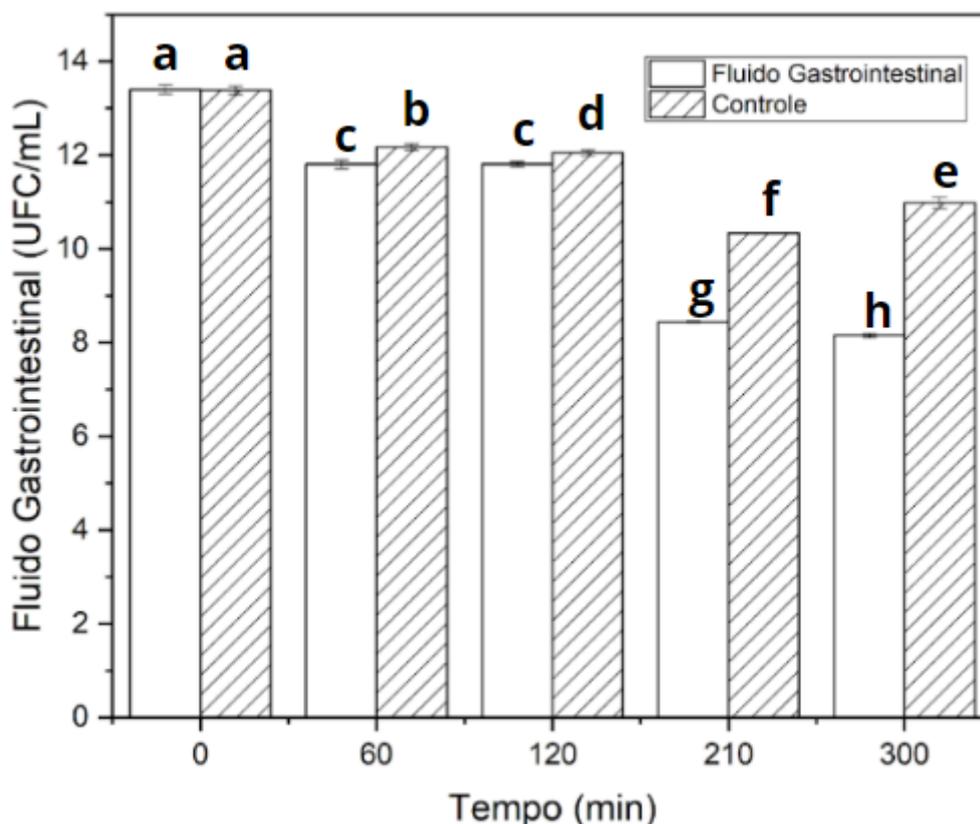
Avaliar a tolerância ao sal biliar é essencial para garantir que probióticos, suplementos e outros aditivos sejam eficazes após a ingestão. Diante as diferenças entre a fisiologia digestiva de humanos e aves, esse teste ajuda a garantir que os produtos sejam adequados às suas necessidades específicas, promovendo melhor saúde intestinal, absorção de nutrientes e desempenho geral. Essa resistência pode ser vantajosa para a sobrevivência de *Z. mobilis* Z1-96 em condições intestinais,

assim, influenciando na sua capacidade de desempenhar um papel probiótico ou outras interações com o hospedeiro.

5.3.5 TESTE *in vitro* DE TOLERÂNCIA GASTROINTESTINAL

Para as análises *in vitro* do fluido gastrintestinal foi observado um número inicial de \log_{10} 13,4 UFC/mL no momento zero após a inoculação no fluido gástrico. Este número diminuiu para \log_{10} 11,8 UFC/mL durante o período de incubação de 120 minutos, indicando a capacidade da cepa em sobreviver às condições simuladas do ambiente gástrico. Após um período adicional de 90 minutos no fluido intestinal (totalizando 210 minutos desde o início do experimento), observou-se uma redução no número de UFC para \log_{10} 8,44 UFC/mL. Após 180 minutos adicionais no fluido intestinal (totalizando 300 minutos), o número de UFC diminuiu para \log_{10} 8,15 UFC/mL, conforme ilustrado na Figura 5 abaixo.

Figura 5 - Teste Simulado do Trato Gastrointestinal da cepa *Z.mobilis* Z1-96.



Legenda: Medidas com "a, c" as mesmas letras na mesma linha não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$); b, d, f, h, e para grupos diferentes apresentam diferença significativa ($P > 0,05$); Calculado por ANOVA unidirecional. **FG = suco gástrico simulado; FI = suco intestinal**

simulado;

Fonte: Autora, 2024.

Quando comparamos estatisticamente observamos que não houve diferença significativa no momento de 0 min entre o controle e o fluido gastrintestinal, também não houve diferença para o fluido gastrintestinal no tempo de 60 e 120 minutos, a demais amostras houve diferença significativa.

Rastogi *et al.*, (2020) observaram uma leve redução na contagem inicial de células (*Lactobacillus mucosae*) quando tratado com pepsina. Após 4 horas de experimento, observou-se um comportamento similar a nossas análises, onde foi possível visualizar uma redução na contagem de células.

Por outro lado, Zhu *et al.*, (2020) constaram em seus estudos que durante o ensaio de tolerância ao suco gástrico simulado *in vitro*, a cepa *Lactobacillus sanfranciscensis* apresentou uma redução significativa ($P < 0,05$) na viabilidade dos probióticos após 60 minutos de exposição ao suco gástrico simulado. Este resultado, que foi detectado somente em nossas análises após um período de 210 minutos (equivalente a 90 minutos no fluido intestinal), destaca a relevância dos resultados obtidos em nosso estudo.

Apesar da diminuição no registro logarítmico, é perceptível a sobrevivência de unidades formadoras de colônias (UFC), indicando a habilidade da cepa Z1-96 de persistir em ambientes com baixa acidez e elevada atividade enzimática características do trato gastrointestinal como demonstrado na Figura 5. Essa resistência é importante para consolidar o potencial desta cepa como um probiótico eficaz.

O teste de fluido gastrintestinal é crucial para verificar se os probióticos conseguem sobreviver nas condições do trato digestivo (Almeida 2022). Para que sejam eficazes, eles precisam resistir a essas condições, aderir à mucosa intestinal e produzir substâncias benéficas. Isso é vital para a saúde intestinal, o desempenho e o bem-estar das aves, além de garantir a segurança alimentar para nós (Rossi 2005).

5.4 ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA CEPA DE *Z. mobilis*

A análise da atividade antagônica apresentou resultados satisfatórios para cepa *Z. mobilis* Z1-96, frente a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, com uma média de 19 mm para os halos de inibição (Tabela 2). Esses resultados estão em consonância com Lima *et al.* (2011), que ao analisar as cepas

Z1-86A, Z1-86B, Z1-87 e Z1-88 observaram atividade antagônica, em intervalos variáveis, de 5 a 13 mm contra a bactéria *S. aureus*.

A atividade de *Z. mobilis* frente às bactérias Gram negativas *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414 e *Escherichia coli* UFPEDA 224, também foi analisada. A cepa *Z. mobilis* Z1-96 apresentou uma média de halos de inibição 19 mm e 21 mm de diâmetro para *E. coli* UFPEDA 224 e *S. enteritidis* UFPEDA 414, respectivamente (Tabela 2). Como observado, *Z. mobilis* demonstrou potencial antagônico frente às cepas patogênicas analisadas, como demonstrado nas análises de Lima (2002). Contudo, a cepa *Z. mobilis* Z1-96 não apresentou atividade antimicrobiana para os microrganismos *Candida albicans* UFPEDA 1007 e *Candida guilliermondii* UFPEDA 6364.

Tabela 2: Atividade antagônica da cepa *Z. mobilis* Z1-96 frente a bactérias patogênicas.

Z1-96 frente a Bactérias Patogênicas	Halo de inibição (mm)
<i>S.aureus</i>	19 mm ± 0,01
<i>E.coli</i>	19 mm ± 0,07
<i>S.enteritidis</i>	21 mm ± 0,01

Legenda: Média (\pm desvio-padrão) dos resultados de três experimentos separados.

Fonte: Autora, 2024.

O desvio padrão variou entre 0,01mm á 0,07 mm.

A atividade apresentada pela cepa *Z. mobilis* Z1-96 pode estar relacionada a um dos possíveis mecanismos de ação da atividade antimicrobiana de liberação de compostos ácidos e substâncias do tipo bacteriocinas, uma vez que, essas substâncias apresentam espectro de ação mais restrito às espécies taxonomicamente próximas (Lima, 2022).

Esses ácidos, quando presentes em concentrações elevadas, podem exercer um efeito antimicrobiano mais forte (Rutkis *et al.*, 2022). A produção desses ácidos é essencial para uma bactéria probiótica, pois eles ajudam no processo de acidificação do meio impedindo o crescimento dos microrganismos patogênicos.

5.5 AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS DE SEGURANÇA

5.5.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A análise do teste antibiograma demonstrou que a cepa Z1-96 UFPEDA 363 apresentou sensibilidade a oito dos nove antibióticos testados, com médias de halos entre 43,5 mm e 10,5 mm. Como demonstrado na Tabela 3, a cepa Z1-96 se apresentou resistente apenas para o antibiótico Ciprofloxacina, o desvio padrão variou de 0,35 a 3,88.

Tabela 3 - Antibióticos testes frente a Cepa *Z.mobilis* Z1-96.

Z1-96 frente a antibióticos	Halo de Sensibilidade (mm)
Amicacina 30 ug	23,75 mm ± 3,88
Ampicilina 10 ug	23 mm ± 2,82
Azitromicina 15 ug	26,75 mm ± 0,35
Aztreonam 30 ug	15 mm ± 2,12
Cefuroxima 30 ug	26,25 mm ± 1,76
Ciprofloxacina 05 ug	-
Penicilina 10 g	10,5 mm ± 1,41
Polimixina 300 ug	15 mm ± 1,41
Tetraciclina 30 ug	43,5 mm ± 1,41

Legenda: Média (\pm desvio-padrão) dos resultados de três experimentos separados.

Fonte: Autora, 2024.

A sensibilidade aos antimicrobianos testados confere a essa cepa uma característica exigida para o desenvolvimento de um produto probiótico. Esses antibióticos são utilizados na avicultura para tratamento de infecções bacterianas, como doenças respiratórias e infecções do trato gastrointestinal.

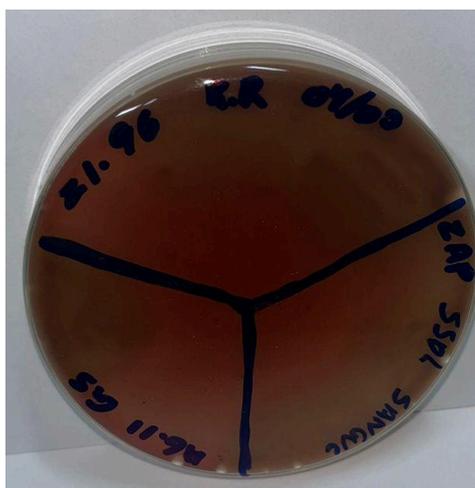
Dessa forma, a bactéria pode auxiliar melhorando a saúde das aves, promovendo um equilíbrio da microbiota intestinal e fortalecendo o sistema imunológico, mesmo durante tratamentos com antibióticos, podendo reduzir o risco de resistência bacteriana ao evitar a transferência de genes de resistência para patógenos indesejados (Lopes *et al*, 2022).

5.5.2 TESTE DE HEMÓLISE

O teste de hemólise é fundamental para identificar a patogenicidade de microrganismos, classificar bactérias e desenvolver tratamentos eficazes (Guastalli *et al.*, 2010). No caso das aves, esse teste é especialmente importante para prevenir e tratar infecções bacterianas, assegurando a saúde e o bem-estar dos animais. Isso, por sua vez, contribui para a segurança alimentar dos humanos (Da silva reviello *et al* 2024).

A análise constatou que a cepa *Z.mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 não manifestaram ação hemolítica (Figura 6), o que confirma que a cepa estudada não é capaz de causar a hemólise do sangue, não gerando, portanto, o rompimento da membrana celular das hemácias e assim sem risco à saúde. A importância de utilizar probióticos sem manifestação de hemólise reside na garantia de segurança e eficácia.

Figura 6 - Teste de hemólise com a cepa *Z.mobilis* Z1-96.



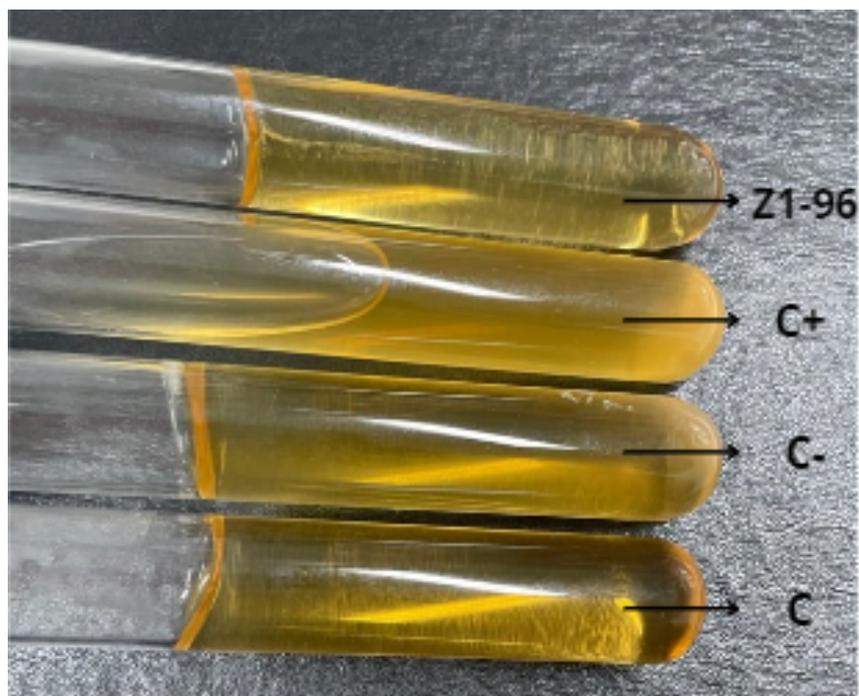
Fonte: Autora, 2024.

5.5.3 TESTE DE GELATINASE

A enzima gelatinase hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. A cepa Z1-96 apresentou ausência da enzima testada

(Figura 7), assim como relatado por Mahasneh et al. (2015), que ao analisarem 17 isolados de *Lactobacillus spp.* com potencial probiótico, e observaram valores negativos para a atividade gelatinolítica, dados que corroboram com o presente estudo.

Figura 7 - Teste gelatinase com a cepa *Z.mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 e microrganismos testes.



Legenda: Z1-96 = *Zymomonas mobilis* UFPEDA 363; C+ = *Staphylococcus aureus*; C- = *Escherichia coli*; C = Meios de cultura SSDL+GELATINA.

Fonte: Autora, 2024.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que a cepa da *Zymomonas mobilis* Z1-96 UFPEDA 363 possui um bom crescimento em condições adversas como pH ácido e na presença de sais biliares. A cepa apresentou uma atividade antimicrobiana promissora, produzindo substâncias capazes de inibir o crescimento de *Salmonella enteritidis* UFPEDA 414, *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02. Demonstrou excelente poder de agregação tanto na auto-agregação, quanto na co-agregação com alta hidrofobicidade celular, indicando boa atividade de adesão celular. A cepa estudada é considerada segura não sendo capaz de produzir enzimas hemolíticas e gelatinolíticas. Ainda, apresenta forte perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Contudo, ainda são necessários mais estudos para confirmar as suas propriedades probióticas *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual. 2023**. Disponível em: <https://abpa-br.org/> Acesso em: 02 de março de 2023.
- ADZITEY, F. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. **Worlds Veterinary Journal**, v. 6, n. 1, p. 36, 2015.
- ALANDER, M., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Matilla-Sandholm, T., & Wright, A. (1997). Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. **Letters in Applied Microbiology**, 24, 361–364.
- ALMEIDA, Bernardo. **Encapsulação de simbióticos para a modulação do microbiota-gut-brain-axis**. 2022. Tese de Doutorado.
- ALVES, Eloisa. **Red Blood Cell (RBC) – Teste de hemólise: Uma alternativa ao Teste de Draize-Irritação Ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no Controle de Qualidade**. *Eloisa Nunes Alves*. Tese (Mestrado). INCQS, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2003.
- ASLAM, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, Volume 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- BELLON-FONTAINE, M. N., Rault, J., & van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. **Colloids and Surfaces**, 7, 47–53.
- CAMPOS, I. A. *et al.* *Zymomonas mobilis* culture protects against sepsis by modulating the inflammatory response, alleviating bacterial burden and suppressing splenocyte apoptosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 1–8, 2013.
- CHEN, YING-CHU; YU, YU-HSIANG. *Bacillus licheniformis*–fermented products improve growth performance and the fecal microbiota community in broilers. **Poultry science**, v. 99, n. 3, p.1432-1443,2020.
- CLAVIJO, V.; FLÓREZ, M. J. V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. **Poultry Science**, v. 97, n. 3, p.1006–1021, 2018.
- COSTA, M. C. *et al.* **Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken**. PLoS ONE, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2017.
- DAI, Jinyue, *et al.* “Isolation and Identification of New Source of Bacteriocin-Producing *Lactobacillus Plantarum* C010 and Growth Kinetics of Its Batch Fermentation.” **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 38, no. 4, 5 Mar. 2022, <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03244-1>. Accessed 18 July 2023.
- DA COSTA, W. K. A., DE SOUZA, G. T., BRANDÃO, L. R. DE LIMA, R. C., GARCIA, E. F., DOS SANTOS LIMA, M., ... & MAGNANI, M. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. **Food Research International**, v. 108, p. 172-182, 2018.
- DANIALI, Marzieh; NIKFAR, Shekoufeh; ABDOLLAHI, Mohammad. Propagação de resistência a antibióticos por meio de probióticos. **Opinião de especialista em metabolismo e toxicologia de medicamentos**, v. 16, n. 12, p. 1207-1215, 2020.
- DA SILVA REVIELLO, Juliana. **Fundamentos da Microbiologia Veterinária**. Freitas Bastos, 2024.

DAVIS, G. S. *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2018.

DE ARAÚJO, L. C. A. *et al.* Molecular identification and physiological characterization of *Zymomonas mobilis* strains from fuel-ethanol production plants in north-east Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 54–63, 2018.

DE AZERÊDO, G. A. *et al.* *In vivo* assessment of possible probiotic properties of *Zymomonas mobilis* in a Wistar rat model. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 1–7, 2010.

DE LIMA, O. *et al.* Estudos de microorganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I. Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928). **Rev. Inst. Antibiot.** Univ. Recife, v. 10, p. 3– 15, 1970.

DE SILVA T. A., A. *et al.* **Effect of zymomonas mobilis probiotic on cholesterol and its lipoprotein fractions and the intestinal regulation.** Clinical Nutrition, 2020.

DING, J., DAI, R., YANG, L., HE, C., XU, K., LIU, S., ... & MENG, H. Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1967, 2017.

DO NASCIMENTO, Everton Giovanni Pereira; BALBINOT, Marciano. FATORES QUE INFLUENCIAM NO GANHO DE PESO DOS FRANGOS DE CORTE. **Anais de Agronomia**, v. 1, n. 1, p. 99-110, 2020.

EL JENI, R., DITTOE, D. K., OLSON, E. G., LOURENCO, J., CORCIONIVOSCHI, N., RICKE, S. C., & CALLAWAY, T. R. Probiotics and potential applications for alternative poultry production systems. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101156, 2021.

EMBRAPA. **Anuário 2019 da Avicultura Industrial.** no11. site:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190390/1/final9033.pdf>>.

EMBRAPA. **Anuário 2020 da Avicultura Industrial.** Edição 1294. no 11. site:<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1117389/1/final9340.pdf>>.

EMBRAPA. **Anuário 2021 da Avicultura Industrial.** Edição 1304. no 10. site:<chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcgclclefindmkaj/https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190390/1/final9033.pdf>.

EMBRAPA. **Anuário 2022 da Avicultura Industrial.** Edição 1323. no 09. site:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/>>

ESTATÍSTICAS - **Central de Inteligência de Aves e Suínos (CIAS) - Portal Embrapa.** Embrapa.br. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

Farias, Thaísa Gabriela Silva de. **Viabilidade de Lactobacillus rhamnosus e Lactobacillus casei encapsulados em sorvete de cajá.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.

FEYE, K. M. *et al.* Influential factors on the composition of the conventionally raised broiler gastrointestinal microbiomes. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 653–659, 2020.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p.365-378, 1988.

FRETER, M. (1992). Factors affecting the microecology of the gut. In R. Fuller (Ed.), Probiotics. **The scientific basis** (pp. 111–145). Glasgow: Chapman & Hall.

GADDE, U. D. *et al.* Antibiotic growth promoters virginiamycin and bacitracin methylene disalicylate alter the chicken intestinal metabolome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2–9, 2018.

GONÇALVES DE LIMA, O. *et al.* new observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. ecological aspects of some problems in microbiology. **revista do instituto de antibióticos**, v. 12, p. 57-69, 1975.

GONCALVES DE LIMA, O.; SCHUMACHER, I. E.; DE ARAUJO, J. M. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev Inst Antibiot Recife**, v. 12, p. 57–69, 1972.

GOMES, PAULA . Observações sobre a utilização de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver & Van Niel, 1936 (*Thermobacterium mobile* lindner, 1928: *Pseudomonas lindneri* kluyver & hoppenbrouwers, 1931) na terapêutica humana. **Revista do instituto de antibióticos**, v.2, p.77-81, 1959.

GUASTALLI, E. A. L. *et al.* Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 153-157, 2010.

JHA, R., Das, R., Oak, S., & Mishra, P. (2020). **Probióticos (micróbios alimentados diretamente) na nutrição de aves e seus efeitos na utilização de nutrientes, crescimento e desempenho de postura e saúde intestinal: uma revisão sistemática.** *Animals: um periódico de acesso aberto do MDPI* , 10. <https://doi.org/10.3390/ani10101863> .

KHAN, Samiullah *et al.* The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 13, p. e00600-20, 2020.

KHOJAH, Ebtihal *et al.* A análise in vitro de pós-bióticos em Labneh funcional será usada como ferramenta poderosa para melhorar as propriedades das superfícies celulares e o potencial de adesão de cepas probióticas. **Fermentação** , v. 8, n. 3, p. 122, 2022.

KOS, B; SUSKOVIC, J. S; IMPRAGA, M. S; FRECE, J; MATOSIC, S; VUKOVIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, 29 jan. 2003.

LEE, Sangki; LEE, Joongjae; JIN, Yong-ik; *et al.* Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 518–524, 2017. Acesso em: 16 jul. 2034.

LI, J. Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production - A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 12, p. 1667–1673, 2017.

LIMA, G. M. DE S. *et al.* Detection of bacteriocins in *Zymomonas mobilis* and RAPD fingerprinting of the producer strains. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n.19, p. 2132–2139, 2011.

LOPES, Idael Matheus Góes *et al.* PROTEASE EXÓGENA: EFEITOS NA SAÚDE INTESTINAL E DESEMPENHO EM AVES E LEITÕES DESMAMADOS. **Ciência Animal**, v. 32, n. 4, p. 136-148, 2022.

LOW, C. X., TAN, L. T. H., AB MUTALIB, N. S., PUSPARAJAH, P., GOH, B. H., CHAN, K. G., ... & LEE, L. H. **Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review.** *Antibiotics*, v. 10, n. 5, p. 578, 2021

MÄESAAR, M. *et al.* Antimicrobial resistance and multilocus sequence types of *Campylobacter jejuni* isolated from Baltic broiler chicken meat and Estonian human patients. **Poultry Science**, v. 97, n. 10, p. 3645–3651, 2018.

MAGALHÃES, T. O. **Características e vantagens da *Zymomonas mobilis* na indústria de etanol.** Monografia apresentada para o curso de Engenharia Bioquímica da Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, v. 53, n. 9, p. 1689– 1699, 2016.

MAHASNEH, A. M.; HAMDAN, S.; MAHASNEH, S. A. Probiotic Properties of Lactobacillus Species Isolated from Local Traditional Fermented Products. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.2,p.81-87, 2015

MANAFI, M. et al. Comparison of performance and feed digestibility of the non- antibiotic feed supplement (Novacid) and an antibiotic growth promoter in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 2, p. 904–911, 2019.

MANDAL, A., MANDAL, R. K., YANG, Y., KHATRI, B., KONG, B. W., & KWON, Y. M. In vitro characterization of chicken gut bacterial isolates for probiotic potentials. **Poultry Science**, v. 100, n. 2, p. 1083-1092, 2021

MEHDI, Y., LÉTOURNEAU-MONTMINY, M. P., GAUCHER, M. L., CHORFI, Y.,SURESH, G., ROUISSI, T., ... & GODBOUT, S. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. **Animal nutrition**, v. 4, n. 2, p. 170-178, 2019

MESQUITA, A. R. C. DE. **Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como microrganismo probiótico**. 2008.

MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 6, p. 1334–1346, 2018.

OGBUEWU, M. Mabelebele, N. Sebola e C. Mbajjorgu. Probióticos de Bacillus como alternativas aos antibióticos na ração e sua influência no crescimento, química sérica, estado antioxidante, histomorfologia intestinal e pontuações de lesões em frangos de corte desafiados por doenças. **Frontiers in Veterinary Science** , 9 (2022). <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.876725>

OTERO, M. C., Ocana, V. S., & Macias, E. N. M. (2004). Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. **Methods in Molecular Biology**, 268, 435–440.

PALLACH, M. *et al.* *Zymomonas mobilis* exopolysaccharide structure and role in high ethanol tolerance. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 293–299, 2018.

PEREIRA R. B. **O extrato vegetal de pracaxi (*Pentaclethra macroloba*, kuntze) em substituição a um antibiótico promotor de crescimento utilizado para frangos de corte**. 2012. Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós - Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, pela Universidade Federal Rural da Amazônia.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v.26, n.3, p.278-282, 2009

PEDERSEN, K., & Tannock, G. W. (1989). Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, 55, 279e283.

PESCIAROLI, M. *et al.* Antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* are less frequently isolated from poultry raised using non-conventional management systems than from conventional broiler. **International Journal of Food Microbiology**, v. 314, n. October 2019,p. 108391, 2020.

RAMLUCKEN, U. *et al.* A novel Bacillus based multi-strain probiotic improves growth performance and intestinal properties of Clostridium perfringens challenged broilers. **Poultry Science**, v. 99, n. 1, p. 331–341, 2020b.

RASTOGI, S.; MITTAL, V.; SINGH, A. *In vitro* evaluation of probiotic potential and safety assessment of Lactobacillus mucosae strains isolated from donkey's lactation. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, n. 3, p. 1045-1056, 2020.

REDONDO, Nadia *et al.* **Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416**. 2008. Dissertação (Mestrado em alimentos e nutrição) - Universidade Estadual Paulista, [S. l.], 2008.

REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. **Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens.** Canadian, J. Microbiol..., v.34,p.344–351, 1988.

ROSSI, Antonio Augusto. **Biossegurança em frangos de corte e saúde pública: limitações, alternativas e subsídios na prevenção de salmoneloses.** 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

RUTKIS, R.; Ľaša, Z.; Rubina, M.; Ščerbaka, R.; Kalniņš, G. Bogans, J.; Kalnenieks, U. **Antimicrobial Activity of *Zymomonas mobilis* Is Related to Its Aerobic Catabolism and Acid Resistance.** Fermentation 2022, 8, 77.

RUTZ F.; Roll V. F. B., Xavier E. G., Anciuti M. A., Lopes D. C. N. **Fisiologia da digestão e da absorção em aves.** Avicultura. Engormix. 2015.

SANTANA, N.G; LIMA, G.M.S. **Avaliação da característica probióticas de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 205 e seu uso como alternativa de controle de salmonelose aviária.** Anais da 26ª Jornada Científica da Facepe, 2022.

SCILLATO, Marina; SPITALE, Ambra; MONGELLI, Gino; PRIVITERA, Grete; MANGANO, Katia; CIANCI, Antonio; STEFANI, Stefania; SANTAGAT, Maria. Antimicrobial properties of Lactobacillus cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. **Microbiology Open Wiley**, 29 jan. 2021. DOI: 10.1002/mbo3.1173. Disponível em: ORIGINAL ARTICLE. Acesso em: 13 fev. 2024.

SHANG, Y., KUMAR, S., OAKLEY, B., & KIM, W. K. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 254, 2018.

SMIALEK, M., BURCHARDT, S., & KONCICKI, A. The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with Campylobacter spp.-Field study. **Research in veterinary science**, v. 118, p. 312-316, 2018.

SWINGS, J.; DE LEY, J. **The biology of *Zymomonas mobilis*.** Bacteriology Reviews, v. 41, p. 1-46, 1977.

TAREB, Raouf et al. Caracterização in vitro das propriedades de agregação e adesão de formas viáveis e mortas pelo calor de duas cepas probióticas de *Lactobacillus* e interação com bactérias zoonóticas transmitidas por alimentos, especialmente Campylobacter jejuni. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 637-649, 2013.

TENG, P. Y.; KIM, W. K. Review: Roles of prebiotics in intestinal ecosystem of broilers. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. OCT, p. 1–18, 2018.

VIECO-SAIZ, N. *et al.* Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–17, 2019.

ZAGHARI, M.; SARANI, P.; HAJATI, H. Comparison of two probiotic preparations on growth performance, intestinal microbiota, nutrient digestibility and cytokine gene expression in broiler chickens. **Journal of Applied Animal Research**, v. 48, n. 1, p. 166–175

ZHU, Wenjie et al. **Functional efficacy of probiotic *Lactobacillus sanfranciscensis* in apple, orange and tomato juices with special reference to storage stability and *in vitro* gastrointestinal survival.** Beverages, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.