

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA

**Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como
microrganismo probiótico**

AMANDA RAFAELA CARNEIRO DE MESQUITA

Recife, 2008

AMANDA RAFAELA CARNEIRO DE MESQUITA

**Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como
microrganismo probiótico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Patologia
da Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eulália de Azevedo Ximenes

Co-Orientador: Prof.^o Dr^o Nicodemos Teles Pontes Filho

Recife, 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: AMANDA RAFAELA CARNEIRO DE MESQUITA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA DISSERTAÇÃO: "CARACTERIZAÇÃO DE *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355
COM MICRORGANISMO PROBIÓTICO"

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA, EULÁLIA AZEVEDO XIMENES

CO-ORIENTADO: PROFESSOR DOUTOR, NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA

DATA: 28 DE AGOSTO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Profa. Dra. Maria Bernadete Sousa Maia

Prof. Dr. Nicodemus Teles de Pontes Filho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof.^o Dr.^o Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS ACADÊMICOS

Prof.^o Anísio Brasileiro de Freire Dourado

CHEFE DE DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof.^a Dr.^a Adriana da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof.^o Dr.^o Nicodemos Teles Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof.^o Dr.^o Hilton Justino da Silva

ORIENTAÇÃO DA TESE

Prof.^a Dr.^a Eulália de Azevedo Ximenes

Prof.^o Dr.^o Nicodemos Teles Pontes Filho

*“As grandes obras são realizadas
não pela força,
mas pela perseverança.”*

Autor desconhecido

Aos meus pais, Djalma e
Veronice Mesquita, por
todo amor, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fé, saúde e por todas as experiências e oportunidades que me proporcionou.

À minha irmã, Patrícia Mesquita e a toda minha família por estarem sempre me apoiando e me valorizando em tudo o que faço.

À professora Eulália de Azevedo Ximenes pelos ensinamentos, confiança, atenção, paciência e por ter acreditado mais em mim do que eu mesma. Agradeço também por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa, por me ensinar a ser persistente e pela enorme contribuição que teve em toda a minha formação.

Ao Profº Nicodemos Teles pela colaboração na realização deste trabalho, por toda paciência e carinho, sempre me tranquilizando com uma palavra de incentivo.

Às amigas de infância, Luana e Mariana Amorim pela amizade, força e por estarem ao meu lado em todos os momentos, sempre me estimulando.

Às amigas da graduação Adriana Andrade, Ana Luiza Ramos, Ivana Porto pelo apoio incentivo, paciência e amizade. À Anabelle Bezerra e Claudia Escorel amigas que mesmo distante estavam sempre torcendo por mim e me dando encorajamento.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos: Nadja Graciele, Tatianne Ribeiro, Sarah Rodrigues, Lucas Leite, Lucas Pacheco pela amizade, companheirismo, consideração e, em especial a Tiago Fernandes por toda ajuda, estímulo, admiração e respeito.

Às amigas do Curso de Pós-graduação em Patologia: Anna Lenira Paiva, Mirella Sant'anna e Ana Thereza Camacho pela amizade e pelos momentos divertidos e agradáveis que passamos juntas.

Às Prof.^{as} Teresinha Gonçalves, Márcia Nascimento e Maria do Carmo Alves de Lima por toda a ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao Dr^o Luiz Carlos Alves e Dr^o Fábio Brayner, meus primeiros orientadores, pela consideração, companheirismo e amizade.

Aos colegas do Laboratório do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROLAB), em especial a Andréa Luiza, Fernanda Muliterno, Isaías Florêncio, Paulo Inojosa e Wildemar Santana pela amizade, companheirismo e compreensão.

Aos colegas do Laboratório Municipal de Camaragibe (LAMUC) Antonio Amato, Carla Cecília, Edna Lima e Humberto Bertão pela ajuda e colaboração nas trocas e “fugas” necessárias de plantão.

A Sidcley Araújo pela ajuda, dedicação e paciência na elaboração das lâminas.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial a Orlando Silva e Luis Carlos Silva.

À Ielma Ferro pela atenção e enorme contribuição na busca dos artigos.

Às funcionárias do Mestrado em Patologia, Ana Carolina Felix Agra e Marilene Gomes da Silva pela ajuda na reta final deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesta caminhada.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Descrição esquemática geral do sistema imune associado à mucosa intestinal.....	10
FIGURA 2: Interação entre os componentes bacterianos (<i>Lactobacillus grasseri</i>) e a célula dendrítica.....	11
FIGURA 3: Aspecto macroscópico das colônias (A) e microscópico (1000 x) (B) de <i>Zymomonas mobilis</i>	13
FIGURA 4: Esquema da avaliação da atividade antagônica de <i>Zymomonas mobilis</i> frente seis diferentes tipos de patógenos.....	24
FIGURA 5: Esquema prático para avaliação da ácido-bile tolerância de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355.....	27
FIGURA 6: Esquema prático para a determinação <i>in vitro</i> da suscetibilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 aos antimicrobianos.....	29
FIGURA 7: Esquema para determinação da atividade antagônica de diferentes concentrações de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	30
FIGURA 8: Atividade antagônica de 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> (1-UFPEDA 199, 2-UFPEDA 200, 3- UFPEDA 201, 4-UFPEDA 202, 5- UFPEDA 208, 6- UFPEDA 355, 7- UFPEDA 356, 8- UFPEDA 204, 9- UFPEDA 358, 10-Z297) frente a 4 dos 6 gêneros de microrganismos estudados: A) <i>Staphylococcus aureus</i> IC 138, B) <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) O157:H7, C) <i>Salmonella enterica</i> Anatum P 58, D) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 14.....	37
FIGURA 9: Atividade antimicrobiana dos seguintes antimicrobianos: 1-Eritromicina; 2-Cefoxitina; 3- Azitromicina; 4- Ofloxacina; 5- Sulfazotrim; 6- Imipenem; 7- Cloranfenicol; 8- Amoxicilina/Ácido Clavulânico; 9- Amicacina; 10- Ampicilina sobre <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 355.....	44

FIGURA 10: Atividade antagônica de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 (10^6 UFC/mL). **A:** *Z. mobilis* (10^7 UFC/mL); **B:** *Z. mobilis* (10^8 UFC/mL); **C:** *Z. mobilis* (10^9 UFC/mL). Valores de pH das culturas de *Z. mobilis*, de sua co-cultura com *E. coli* ATCC 8739 ao longo de 24 horas.....47

FIGURA 11: Atividade antagônica de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 frente a *Escherichia coli* O157:H7 (10^6 UFC/mL). **D:** *Z. mobilis* (10^7 UFC/mL); **E:** *Z. mobilis* (10^8 UFC/mL); **F:** *Z. mobilis* (10^9 UFC/mL). Valores de pH das culturas de *Z. mobilis*, de sua co-cultura com *E. coli* O157:H7 ao longo de 24 horas.....48

FIGURA 12: Cultura de sangue de seis camundongos tratados com *Zymomonas mobilis*. Ausência de crescimento bacteriano no meio ágar sangue e no ágar MacConkey. **G2:** Grupo tratado com *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355; **C:** camundongo.....50

FIGURA 13: Cortes histológicos do baço (200x) (**A**), intestino (100x) (**B**), rim (**C**) (200x) e fígado (100x) (**D**) de camundongo tratado com *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355, mostrando o aspecto morfológico normal, dos respectivos órgãos.....51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Origem e ano de isolamento das linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i>	19
TABELA 2	Origem e perfil de suscetibilidade dos microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos.....	20
TABELA 3	Atividade antagônica de dez linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> frente diversas cepas de microrganismos patógenos.....	36
TABELA 4	Viabilidade de <i>Zymomonas. mobilis</i> UFPEDA 355 em log ₁₀ UFC/mL após 4 horas de contato em meio SSDL acidificado.....	40
TABELA 5	Viabilidade de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 355 (log ₁₀ UFC/mL) após 4 horas com meio SSDL contendo diferentes concentrações de bile bovina.....	42
TABELA 6	Suscetibilidade de <i>Zymomonas. mobilis</i> UFPEDA 355 a dez antimicrobianos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC	Ácido clavulânico/ Amoxicilina
AMOX	Amoxicilina
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
AMP-SUB	Ampicilina/Subactam
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
AZI	Azitromicina
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grau Celsius
CECON	Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Gás Carbônico
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
DP	Desvio-padrão
ERI	Eritromicina
GAT	Gatifloxacina
GEN	Gentamicina
FIOCRUZ –RJ	Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro
g	grama
h	hora
IA	Isolado de alimento
IC	Isolado clínico
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
INF γ	Interferon gama
IPM	Imipenem
L	Litro
LACEN-PE	Laboratório Central do Estado de Pernambuco
Log ₁₀	logarítimo decimal
MER	Meropenem
mm	milímetro
mL	miliLitro
μ L	microlitro
N	Normal
NT	Não testado
NAL	Ácido Nalidíxico
NIT	Nitrofurantoína

NOR	Norfloxacina
OFX	Ofloxacina
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minutos
SSDL	Meio de cultura Standard Swings e De Ley
SUT	Sulfazotrim
T ₀	tempo inicial
T ₄	tempo após 4 horas de incubação
TEIC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TNF α	Fator de necrose tumoral
TOB	Tobramicina
SZT	Sulfazotrim
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPEDA	Universidade Federal de Pernambuco-Departamento de Antibióticos
v/v	volume/volume
VAN	Vancomicina
X	Média aritmética

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar uma linhagem de *Zymomonas mobilis* como potencial probiótico para isso a pesquisa foi dividida em três etapas. Numa primeira etapa foi avaliada a atividade de dez linhagens de *Z. mobilis* frente a 49 microrganismos patogênicos pertencentes a cinco gêneros bacterianos e um fúngico. Após seleção da linhagem com atividade antagônica e com crescimento satisfatório no meio SSDL foi avaliada sua tolerância ao ácido clorídrico (meio SSDL com pH ajustado para 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0) e bile bovina nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 p/v. Posteriormente foi avaliada a susceptibilidade desta linhagem a dez diferentes antimicrobianos utilizados em clínica médica. Este ensaio foi realizado pela técnica de difusão em meio sólido preconizado pelo CLSI. A segunda etapa deste trabalho constou da determinação do antagonismo quantitativo da cultura de *Z. mobilis* selecionada em co-cultura com *Escherichia coli* O157:H7 ou com *Escherichia coli* ATCC 8739 e do acompanhamento do pH destas culturas. Nesta etapa também foi estudada a influência do inóculo de *Z. mobilis* em diferentes concentrações (10^7 , 10^8 , 10^9 UFC/mL) sobre a sua atividade antagônica ao longo de 24 horas. Na terceira etapa, foi avaliada a possibilidade de translocação de *Z. mobilis* para a corrente sanguínea e para os órgãos vitais em camundongos, após inoculação através de gavagem oral da cultura (10^9 UFC/mL) três vezes ao dia. As linhagens de *Z. mobilis* foram capazes de inibir o crescimento de 10 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, 4 de *Escherichia coli*, 7 de *Staphylococcus aureus* e 5 de *Salmonella enterica* e 1 *Salmonella choleraesuis*, mas não inibiu 10 amostras de *Enterococcus faecalis* nem as 11 de *Candida albicans*. Das dez linhagens, *Z. mobilis* UFPEDA 355 apresentou velocidade máxima de crescimento em meio SSDL, superior as demais, e atividade antagônica sendo selecionada para as etapas posteriores. A linhagem UFPEDA 355 apresentou-se tolerante ao meio SSDL em pH superior a 2,5 e a todas as concentrações de bile ensaiadas. Esta linhagem mostrou um perfil de sensibilidade a cefoxitina, azitromicina, sulfazotrim, imipenem, cloranfenicol, amoxicilina/ácido clavulânico e de resistência a ofloxacina, amicacina e ampicilina. A atividade antagônica de *Z. mobilis* UFPEDA 355 foi dependente da concentração do inóculo, cuja redução das células viáveis, em relação ao controle, foi da ordem de $1,60 \pm 0,06 \log_{10}$ UFC/mL para *E. coli* O157:H7 e de $1,67 \pm 0,07 \log_{10}$ UFC/mL para *E. coli* ATCC 8739. Não houve diferença significativa dos valores do pH da cultura de *Z. mobilis* e de suas co-culturas nos diferentes inóculos ($p < 0,05$). *Z. mobilis* UFPEDA 355 não foi capaz de penetrar na corrente sanguínea, nem de causar alterações morfológicas nos rins, fígado, baço e intestinos de camundongos.

Palavras-chave: Probióticos, *Zymomonas mobilis*, atividade antagônica, microrganismos multidroga resistentes

ABSTRACT

This work had the objective of selecting and characterizing a strain of *Zymomonas mobilis* as a potential probiotic, for this the research was divided into three stages. In the first stage the activity of ten strains of *Z. mobilis* were assessed on 49 pathogenic microorganisms belonging to five bacteria genus and one fungal. After selection of strain with antagonistic activity which had satisfactory growth in the SSDL medium its tolerance to chloridric acid (SSDL medium with pH adjusted to 2.0; 2.5; 3.0; 3.5 and 4.0) and bovine bile in concentrations of 0.125; 0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0 and 4.0 p/v. Subsequently the susceptibility of the strain to ten different antimicrobials used in clinical medicine. This test was carried out by diffusion technique in a solid medium that is praised by the CLSI. A second stage of this work proved the determination of the quantitative antagonism of the *Z. mobilis* culture in a co-culture with *Escherichia coli* ATTC 8739 and pH accompaniment of these cultures. Also in this stage the influence of the *Z. mobilis* inoculation was studied at different concentrations (10^7 , 10^8 , 10^9 CFU /mL) on its antagonistic activity through twenty-four hours. In the third stage, the possibility of *Z. mobilis* translocation to the blood stream was assessed and in vital organs of mice also. After inoculation using gavage method of the culture 10^9 CFU/ mL three times a day. The *Z. mobilis* strains were able to inhibit the growth of 10 samples of *Pseudomonas aeruginosa* , 4 of *Escherichia coli* , 7 of *Staphylococcus aureus* and 5 of *Salmonella enterica* and 1 *Salmonella choleraesuis* , but did not inhibit 10 samples of *Enterococcus faecalis* or even 11 of *Candida albicans*. The ten *Z. mobilis* strains UFPEDA 355 presented a maximum growth velocity above the others, in SSDL medium and the antagonistic activity was selected for the subsequent stages .The UFPEDA 355 strain presented it self as being tolerant to SSDL medium in pH above 2.5 and to all the concentrations of bile tested. This strain showed a sensibility profile to cefoxitin, azitromycin, sulfazotrin, imipenem chloramphenicol, clavulanic acid, amoxicillin and resistance to ofloxacin, ampicillin and amikacin. The antagonistic activity of UFPEDA 355 *Z. mobilis* was dependent of the inoculum concentration whose reduction of viable cells, on the control was $1,60 \pm 0,06 \log_{10}$ CFU/mL for *E. coli* 0157:H7 and $1.67 \pm 0.07 \log_{10}$ CFU/ mL for *E. coli* ATCC 8739. There was no significant difference in pH values for the *Z. mobilis* culture and its co-cultures in the different inocula ($p < 0.05$). The UFPEDA *Z.mobilis* was not able to penetrate the blood stream, not even cause morphological alterations in the kidneys, liver, spleen and intestines of the mice.

Key words: Probiotic, *Zymomonas mobilis*, antagonistic activity, multidrug-resistant microorganisms.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Probióticos.....	3
2.1.1 Propriedades de uma bactéria probiótica.....	4
2.1.2 Utilização de Probióticos em diversas patologias.....	6
2.1.3 Influência dos microrganismos probióticos sobre o sistema imune.....	9
2.2 <i>Zymomonas mobilis</i> como probiótico.....	12
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Geral.....	16
3.2 Específicos.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Materiais.....	17
4.1.1 Microrganismos.....	17
4.1.2 Animais.....	18
4.2 Métodos.....	22
4.2.1 Manutenção da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i>	22
4.2.2 Pré-fermentação e fermentação.....	22
4.2.3 Enumeração das Unidades Formadoras de Colônias.....	23

4.2.4 Teste de Pureza.....	23
4.2.5 Seleção e avaliação da atividade antagônica de diferentes linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a microrganismos patogênicos.....	23
4.2.6 Avaliação da tolerância da cultura de <i>Zymomonas. mobilis</i> UFPEDA 355 frente a diferentes valores de pH.....	25
4.2.7 Avaliação da tolerância da cultura de <i>Zymomonas. mobilis</i> UFPEDA 355 à bile bovina.....	26
4.2.8 Determinação <i>in vitro</i> da suscetibilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 aos antimicrobianos.....	27
4.2.9 Influência da concentração celular de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 sobre sua atividade antagônica frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ou <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	29
4.2.10 Determinação de uma possível translocação de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 da mucosa intestinal dos camundongos para a corrente sanguínea.....	31
4.2.11 Avaliação histológica do fígado, baço, rins e intestino de camundongos após ingestão da cultura de <i>Zymomonas. mobilis</i> UFPEDA 355.....	31
4.2.12 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Avaliação da atividade antagônica de diferentes linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a microrganismos.....	33
5.2 Avaliação da viabilidade celular da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 em meio ácido.....	38
5.3 Avaliação da tolerância de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 355 à bile bovina.....	40
5.4 Determinação da suscetibilidade de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 a diversos antimicrobianos.....	42

5.5 Influência da concentração do inóculo de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355 sobre a atividade antagônica <i>in vitro</i> e sobre o pH da cultura de <i>Z. mobilis</i> em co-cultura com <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ou com <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	45
5.6 Determinação de uma possível translocação de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 355 da mucosa intestinal para a corrente sanguínea.....	49
5.7 Determinação das possíveis alterações dos órgãos vitais (fígado, baço, rim e intestino) de camundongos após ingestão da cultura de <i>Zymomonas mobilis</i> UFPEDA 355.....	50
6 CONCLUSÕES.....	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8 ANEXOS.....	69
8.1 Aprovação do Comitê de Ética.....	69
8.2 Meios de cultura.....	70
8.3 Processamento histológico.....	70
8.4 Indicadores de produção 2006-2008.....	72
8.4.1 Trabalhos apresentados em Congressos.....	72

1 INTRODUÇÃO

As bactérias denominadas probióticas auxiliam o organismo hospedeiro no desempenho de várias funções como proteção a infecções, síntese de vitaminas e enzimas, dentre outras. Quando a microbiota probiótica é reduzida ou eliminada por doenças ou pela administração de antimicrobianos sua reposição é obrigatória (FULLER & GIBSON, 1997).

A utilização de microrganismos com características probióticas faz parte da história da civilização do homem (FULLER, 1988; FULLER & GIBSON, 1997). Microrganismos probióticos são bactérias que produzem efeitos benéficos no hospedeiro, utilizadas para prevenir e/ou tratar doenças, são promotores de crescimento e imunoestimulantes (COPPOLA; TURNÊS, 2004).

Uma destas preparações probióticas é o “aguamiel”, seiva fermentada naturalmente por *Zymomonas mobilis* do *Agave atrovirens*, espécie de planta muito utilizada pelos astecas nos rituais religiosos para prevenção e tratamento de infecções intestinais (GONÇALVES DE LIMA et al, 1970).

O antagonismo microbiano promovido pelos microrganismos probióticos tem assumido um papel importante na tecnologia de alimentos, pois eles estão diretamente relacionados à capacidade de produzir e tolerar uma concentração elevada de ácido láctico, permitindo a inibição de outros microrganismos, favorecendo desta forma à competição com eles num ecossistema. Por isso, crescentes avanços tecnológicos estão sendo desenvolvidos utilizando bactérias ácido-láticas, principalmente na indústria de alimentos. Indústrias como a Danone® e a Nestlé® estão investindo bastante no melhoramento de seus produtos, contendo microrganismos probióticos com o propósito de aumentar a imunidade e reduzir transtornos intestinais dos seus consumidores (BRANDÃO, 2002; CHIODA et al., 2007).

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonetes curtos e largos, pertencente à família *Sphingomonadaceae* e que podem ser encontrados de forma isolada ou aos pares. Seu primeiro isolamento ocorreu em 1911, quando Backer e Hillier estudavam a “doença da Cidra” (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970;

FALCÃO MORAIS, 1982; KOSAKO et al., 2000 *apud* KALNENIEKS, 2006; WHITE et al., 1996,).

Em 1924, Lindner foi o primeiro pesquisador a reportar as propriedades antagônicas da cultura de *Z. mobilis* sobre cocos piogênicos e bactérias entéricas patogênicas. Motivados pelas propriedades antagônicas desse microrganismo, vários médicos da cidade do Recife trataram com êxito casos crônicos de colites, cistites e vulvovaginites (LOPES et al., 1980; MAGALHÃES NETO et al., 1958; PAULA GOMES, 1959; SOUZA; SOUZA, 1973; WANICK et al., 1970). Porém, para que esta bactéria seja classificada como microrganismo probiótico, é necessário que se comprove uma série de características que assegurem sua eficácia e a segurança do consumidor. Esses critérios necessários são resumidos em ser resistente à acidez estomacal, à bile; capacidade de colonizar o trato gastrointestinal e produzir substâncias antimicrobianas capazes de inibir o crescimento de microrganismos patógenos e ser segura para a utilização em humanos (LEE; SALMINEN, 1995).

A translocação bacteriana é um potencial indicador da toxicidade bacteriana e é o primeiro passo para um processo patogênico causado por bactéria endógenas oportunistas. As bactérias atravessam a mucosa intestinal, em direção a lâmina própria, linfonodos mesentéricos e seguem em direção aos órgãos. Subseqüentemente, podem disseminar-se pelo corpo causando septicemia, choque, falhas múltiplas de órgãos e morte (GUARNER; MALAGELADA, 2003; STEFFEN; BERG 1983; ZHOU et al., 2000).

Diante deste relato e sabendo do grande potencial terapêutico de *Z. mobilis*, foi alvo deste trabalho a caracterização de uma cultura de *Z. mobilis* quanto a sua tolerância em meio ácido e em meio contendo bile bovina. Também foi investigada a suscetibilidade da cepa selecionada aos antimicrobianos e seu efeito em co-cultura com microrganismos patogênicos. Uma possível patogenicidade desta cepa para camundongos foi avaliada através da sua translocação da luz intestinal para órgãos vitais. Esses critérios são necessários para enquadrar este microrganismo no conjunto de microrganismos probióticos utilizados em alimentos ou medicamentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Probióticos

O conceito de probióticos foi publicado pela primeira vez em 1908 por um cientista russo, Elie Metchnikoff. Segundo este cientista, o longo tempo de vida observado entre os aldeões búlgaros estaria relacionado ao grande consumo de produtos à base de leite fermentado contendo *Lactobacillus bulgaricus*. (GOMEZ-GIL et al., 1998; SANDERS, 2000; WILLIAMS & WILKINS, 2006).

O termo ‘probiótico’ deriva do grego e significa “pró-vida”. Em 1974, Parker o utilizou para descrever suplementos alimentares que promoviam o crescimento animal (FULLER, 1990).

A definição aceita atualmente é de que são bactérias que produzem efeitos benéficos ao hospedeiro, utilizadas para prevenir e/ou tratar doenças, são promotores de crescimento e imunostimulantes (COPPOLA; TURNÊS, 2004). Deste modo, os probióticos têm sido administrados a humanos e/ou animais experimentais, com a finalidade de prevenir e/ou tratar infecções vaginais, urinárias e, principalmente, intestinais (GUARNER, SCHAAFSMA, 1998).

Vários gêneros de bactérias têm sido utilizados como probióticos, a saber: *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus cereus*. Também tem sido relatada a utilização de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e *Candida pintolopesii* e fungos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (GÓMEZ-GIL et al., 1998; COPPOLA, TURNES, 2004).

As bactérias mais utilizadas em produtos alimentícios são espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ROBERFROID, 2000; BOYLE et al., 2006). Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* e *L. salivarius*; pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*,

B. animalis, *B. longum* e *B. thermophilum* (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

Os iogurtes e leites fermentados são os alimentos mais conhecidos que contém microrganismos probióticos, entretanto algumas variedades de queijo e sorvetes estão sendo estudadas como potenciais carreadores desses microrganismos (STANTON et al., 2001). Produtos como o iogurt da marca Danone (Paris, França) e Yakult (Tóquio, Japão) são exemplos destes alimentos, ambos possuem *Lactobacillus paracasei* na sua constituição, sendo *L. paracasei* Shirota no primeiro, e *L. paracasei* Immunitas no segundo (SANDERS, 2003).

No Brasil são comercializadas várias preparações farmacêuticas probióticas: Floratil[®] - MERCK (*Saccharomyces boulardii* liofilizado); Florax[®] - HEBRON (*Saccharomyces cerevisiae* em flaconetes); Ginoflorax[®] - HEBRON (*Saccharomyces cerevisiae* em comprimidos vaginais); Biovicerin[®] - GEYER (*Bacillus cereus* em flaconetes); Bac-resistente - SANUS (*Lactobacillus acidophilus* em flaconetes); Camboacy - FARMAVY (*Lactobacillus acidophilus* em flaconetes); Leiba - UNIÃO QUÍMICA (*Lactobacillus acidophilus* em flaconetes) (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2000/2001). Nestas preparações farmacêuticas, os microrganismos probióticos podem estar disponíveis como: pós, suspensões ou comprimidos e podem ser incorporados em produtos alimentícios (BRINK et al., 2005).

2.1.1 Propriedades de uma bactéria probiótica

Segundo Lee & Salminen (1995), para uma bactéria ser considerada como probiótica é necessário que ela obedeça a alguns critérios, tais como: ser de origem preferencialmente humana; resistente à acidez estomacal, resistente à bile; possuir a habilidade de colonizar o trato gastrointestinal; produzir substâncias antimicrobianas e ser segura para a utilização em humanos, ou seja, incapaz de causar infecções ao hospedeiro.

Os microrganismos probióticos devem possuir a habilidade para modular respostas do sistema imunológico e influenciar na atividade metabólica, como por exemplo, na assimilação do colesterol, atividade da lactase e produção de vitaminas.

Diversas pesquisas foram realizadas e os mecanismos de atuação dos probióticos foram publicados por FOX, 1988; JIN et al., 1997; BOYLE et al., 2006. Alguns deles foram descritos a seguir:

- No intestino, os microrganismos probióticos realizam uma rápida metabolização de substratos (açúcares, vitaminas, aminoácidos, proteínas) tornando-os indisponíveis aos patógenos e, por consequência, impedindo a proliferação destes. Estudos realizados “in vitro” sugeriram que microrganismos probióticos competiam mais eficientemente por glicose monomérica, N-acetil glucosamina e ácido siálico, que podem ser encontrados no conteúdo do cólon (FERREIRA; ASTOLFI-FERREIRA, 2006);
- Através da produção de ácidos orgânicos: ácido lático, ácido butírico, ácido propiônico e ácido acético, provocam uma redução no pH intestinal, tornando o meio impróprio para a multiplicação de vários patógenos. Esses ácidos orgânicos podem se difundir pela membrana celular e liberar prótons no citoplasma do microrganismo patogênico. Conseqüentemente há dissipação do potencial de prótons da membrana, devido a acidificação do citoplasma, e inibição do mecanismo de transporte de substrato, geração de energia e síntese de macromoléculas (FERREIRA; ASTOLFI-FERREIRA, 2006);
- Os microrganismos probióticos secretam proteínas (bacteriocinas), peróxido de hidrogênio e biossurfactantes para sobreviver ao trato gastrointestinal e poder competir com bactérias patogênicas, inibindo a proliferação e a aderência destas ao epitélio intestinal;
- Podem estimular a produção de anticorpos, citocinas e a atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do corpo;
- Aumentam a atividade enzimática no trato gastrointestinal, através da produção de enzimas como a lactase;
- Alguns probióticos induzem a produção de mucina pelas células do epitélio intestinal. A mucina é uma proteína relacionada com a produção de muco que confere uma proteção maior ao epitélio intestinal;

2.1.2 Utilização de probióticos em diversas patologias

Os probióticos têm sido introduzidos na terapêutica para o tratamento e prevenção de vários transtornos intestinais. Bactérias como: *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* são responsáveis por 85% dos casos desta enfermidade, seguidas pelas parasitoses intestinais, causadas por protozoários e helmintos, com 10% e vírus com 5% (CONNOR, 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2008; ROLFE, 2000; YATES, 2005).

Calderón et al. (2007) avaliou o efeito de diferentes tipos de cultura probiótica em iogurte sobre populações conhecidas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*, potenciais patógenos intestinais, e observaram um efeito inibitório na população destes microrganismos. Matsumoto et al. (2008) demonstraram que a administração oral de *Bifidobacterium longum* protege ratos contra septicemia causada por *Pseudomonas aeruginosa*, um importante patógeno oportunista que possui inúmeros fatores de virulência e que infecta principalmente indivíduos imunocomprometidos (VALDÉZ et al., 2005).

Em pesquisas realizadas com *Lactobacillus kefir* foi observado que estes microrganismos foram capazes de antagonizar *in vitro* a adesão e invasão de *Salmonella enteritidis*, devido à presença de uma proteína S presente na parede celular destes microrganismos. O gênero *Salmonella* é um dos enteropatógenos mais extensivamente estudados, capazes de causar uma variedade de doenças (GOLOWCZYC et al., 2007). Fayol-Messaoudi et al. (2005) demonstraram que várias cepas de lactobacilos foram capazes de induzir um grande decréscimo na viabilidade de *Salmonella enterica* Typhimurium, devido a moléculas, diferentes do ácido láctico, presentes na cultura.

Os microrganismos probióticos também são utilizados no tratamento das doenças intestinais inflamatórias cuja etiologia ainda não está esclarecida. Existe uma hipótese de que estas doenças sejam resultado de uma combinação de fatores genéticos, ambientais e do sistema imunológico (BROEKAERT; WALKER, 2006). Elas são caracterizadas por uma inflamação intestinal crônica e recorrente e incluem colite ulcerativa e doença de Crohn (MARTEAU et al., 2001; WILLIAMS & WILKINS, 2006).

A atuação dos probióticos na redução do risco de aparecimento do câncer é provavelmente dada pela neutralização dos efeitos genotóxicos e mutagênicos (SAAD, 2006). Entretanto, o mecanismo preciso pelo qual probióticos podem inibir a carcinogênese ainda é desconhecido (CAPURSO et al., 2006).

Outra atuação das bactérias probióticas é nas doenças alérgicas cujas reações imunológicas são mediadas por IgE frente a alérgenos ao nível das mucosas nasofaríngea, da conjuntiva, brônquica e da pele. Rinite, asma, edema de glote, eczema atópico, urticária são as manifestações clínicas mais frequentes (DE LUIS et al., 2005). Um exemplo do efeito probiótico é a habilidade destes microrganismos em reduzir sintomas da dermatite atópica (BROEKAERT; WALKER, 2006).

Estudos desenvolvidos por Rautava et al., 2002, comprovaram que o consumo de probióticos contendo *L. rhamnosus* cepa GG por gestantes e lactantes aumentou o nível de fator de crescimento e transformação β , uma citocina antialérgica, no leite materno.

Estudos têm demonstrado que a ingestão de microrganismos vivos contidos em iogurtes tem produzido efeitos benéficos também em portadores de intolerância à lactose, em adultos e crianças (ROLFE, 2000).

A intolerância à lactose é decorrente da deficiência congênita da enzima β -galactosidase. Esta deficiência é responsável pela não digestão e não absorção da lactose (ROLFE, 2000). Além de iogurtes, leites fermentados podem aumentar eficientemente a digestão da lactose e conseqüente liberação de hidrogênio, tornando-a bem tolerada em indivíduos intolerantes à lactose. Uma das razões para estes efeitos é presença da enzima β -galactosidase contida nos produtos fermentados, que realiza a digestão da lactose provavelmente no intestino delgado (VRESE et al., 2001). Assim a atividade da lactase produzida por estes microrganismos no intestino pode facilitar a digestão da lactose, sua subsequente absorção e com isso, promover alguma melhora clínica dos sinais de intolerância à lactose (ROLFE, 2000).

Além dos efeitos benéficos citados em indivíduos intolerantes à lactose, estudos em humanos e em animais têm sugerido que a ingestão diária de produtos fermentados com probióticos também pode reduzir os níveis séricos de lipídios (BROWN; VALIERE, 2004). Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação utilizado pelos probióticos para reduzir os níveis séricos de colesterol, porém alguns autores sugerem que produtos da fermentação bacteriana, especificamente ácidos graxos de cadeia curta

podem inibir a síntese de colesterol no fígado e causar a mobilização do colesterol plasmático para o fígado. Foi sugerido também que esses microrganismos aumentem a atividade da enzima hidrolase, responsável pela hidrólise dos sais biliares, aumentando desta forma a excreção do colesterol (BROWN; VALIERE, 2004).

Lee & Salminen (1995) reportaram que *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM tem considerável capacidade para assimilar colesterol.

Em uma revisão, De Roos e Katan (2000) demonstraram em estudos realizados com seres humanos que a ingestão de *Lactobacillus acidophilus*, e de *Enterococcus faecium* era capaz de reduzir os níveis de colesterol sérico.

Bactérias probióticas também são capazes de promover a proteólise da caseína durante a fermentação do leite, levando à formação de peptídeos bioativos que podem reduzir a pressão sanguínea de hipertensos (SANDERS, 2000).

Estudos realizados em humanos com leite fermentado contendo *L. helveticus* e tripeptídeos bioativos (Isoleucina-Prolina-Prolina e Valina-Prolina-Prolina) mostraram que houve uma significativa redução tanto da pressão sistólica como da diastólica. Sugerindo que esse mecanismo anti-hipertensivo esteja relacionado à inibição da enzima conversora de angiotensina (JAUHIAINEN et al., 2005).

Probióticos podem ser utilizados no tratamento de diversas infecções, como por exemplo, nas infecções urogenitais, causadas principalmente por *Escherichia coli*, responsável por mais de 85% destes casos (FAO/WHO, 2001). Estas infecções caracterizam-se por afetarem rins, bexiga, uretra, vagina e constitui um problema mundial que afeta mais de 300 milhões de mulheres por ano (REID, 2001).

Lactobacillus crispatus cepa CTV05, *L. rhamnosus* cepa GR-1 e *L. fermentum* cepa RC-14 possuem excelente potencial para restaurar a microbiota urogenital e desse modo, reduzir o risco de infecções do trato urinário (REID, 1999). Esta primeira espécie possui a habilidade de colonizar a vagina e produzir *in vitro* peróxido de hidrogênio e está sendo testado para prevenir a recorrência de vaginites bacterianas (REID; BRUCE, 2001).

Produtos do metabolismo dos lactobacilos possuem efeito antagonista contra patógenos urinários e vaginais. Os biosurfactantes inibem a adesão, os ácidos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio inibem o crescimento e as moléculas de agregação bloqueiam a dispersão dos microrganismos patogênicos (REID, 2001).

2.1.3 Influência dos microrganismos probióticos sobre o sistema imune

Macrófagos, neutrófilos, células natural killer e o sistema complemento representam os principais componentes do sistema imunológico, e é a primeira linha de defesa contra muitos microrganismos (FAO/WHO, 2001).

A resposta do sistema imunológico inclui três processos: reconhecimento da partícula estranha, destruição da mesma e por último a regulação da resposta imune através de células especializadas e mediadores, as citocinas. A resposta imune não específica é realizada pelos fagócitos (monócitos/macrófagos, e os neutrófilos) que reconhecem, neutralizam e destroem os microrganismos patogênicos. Enquanto que a resposta específica é produzida pelos linfócitos B que secretam anticorpos e os linfócitos T que produzem citocinas (AMROUCHE, 2005).

As bactérias presentes no lúmen intestinal representam o maior estímulo para o desenvolvimento do sistema imune da mucosa intestinal do hospedeiro. Isto é refletido na imensa quantidade de IgA produzida pelo intestino e na abundância de células T no tecido conjuntivo e no epitélio intestinal. Segundo Motelone et al. (2006), a interação entre a bactéria comensal e as células intestinais podem ocorrer em três sítios distintos: nas células M, nas placas de Peyer e no folículo linfóide isolado. O primeiro contato ocorre ao nível da placa de Peyer, onde a célula M executa a translocação do antígeno bacteriano do lúmen intestinal para o tecido. Antígenos bacterianos também podem entrar no tecido através das células M, sendo mediados pelas células dendríticas. Células dendríticas são células encontradas no intestino e que constantemente apresentam antígenos às células T, resultando na ativação e diferenciação destas últimas (MADSEN, 2006). Outro sítio indutor da resposta imune é representado pelo folículo linfóide isolado, que contém células B assim como células dendríticas e uma pequena quantidade de células T (MONTELONE et al., 2006) (FIGURA 1).

Segundo Neumann et al. (1998) o efeito sistêmico da ingestão de *Lactobacillus acidophilus* poderia ser devido à translocação destes microrganismos para os linfonodos mesentéricos, onde eles poderiam ativar macrófagos e células dendríticas, que liberariam citocinas pró-inflamatórias e ativadoras da fagocitose. Este autor relatou ainda que esta cepa de *Lactobacillus* é capaz de estimular a capacidade de fagocitose dos macrófagos.

De acordo com Amrouche (2005) a interação entre moléculas chamadas de C_pG presentes no DNA das bactérias probióticas com receptores chamados “Toll-Like”, presentes na membrana das células dendríticas, do sistema imunológico, gera um sinal que é transmitido ao núcleo dessas células, induzindo um sinal de transdução que resultará na síntese de citocinas (FIGURA 2).

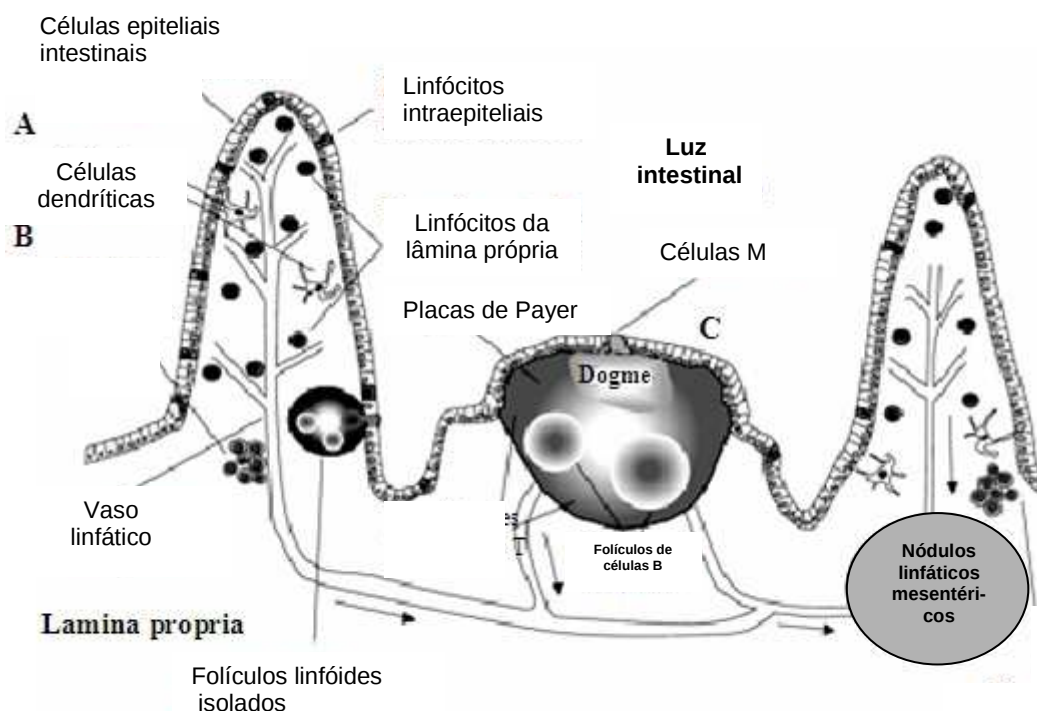


FIGURA 1: Descrição esquemática geral do sistema imunológico associado à mucosa intestinal (AMROUCHE, 2005)

Olivares et al. (2006) demonstraram que com o consumo de produtos contendo a combinação de *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 e *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 induziu um aumento nos níveis séricos de células natural killer, IgA e IgG e também nos níveis fecais de IgA, principal imunoglobulina envolvida na defesa das mucosas. Concluindo que o consumo de probiótico aumenta a proporção de células fagocitárias como monócitos e neutrófilos, e conseqüentemente o processo fagocitário.

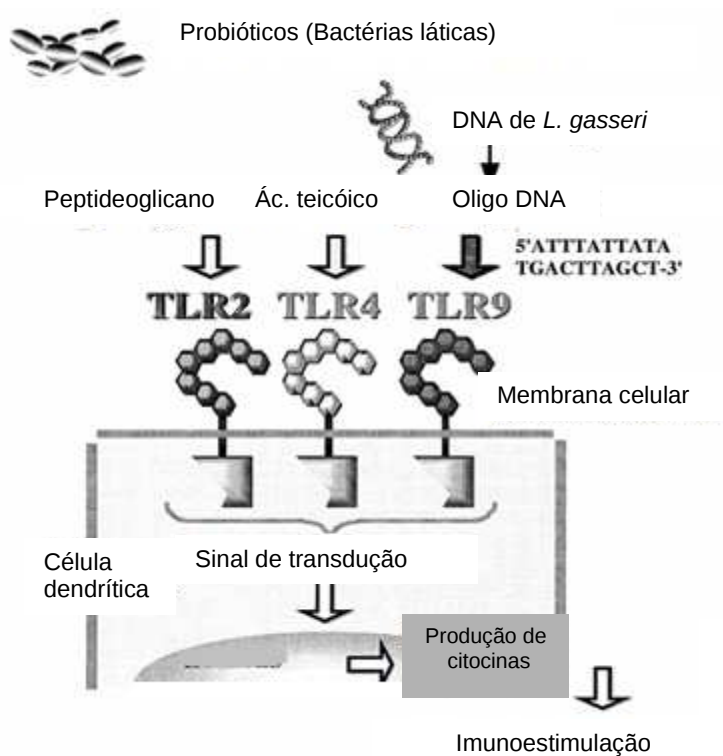


FIGURA 2: Interação entre os componentes bacterianos (*Lactobacillus gasseri*) e a célula dendrítica. TLR = Receptor Toll-Like (AMROUCHE, 2005).

2.2 *Zymomonas mobilis* como probiótico

Zymomonas mobilis são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas e geralmente móveis. Apresentam-se em forma de bastonetes curtos e largos, isolados ou aos pares e, mais raramente, em cadeias de poucas unidades medindo de 2 a 6µm de comprimento e de 1 a 2µm de largura. Podem ser mono ou lofotríquias, apresentando 1 ou 4 flagelos com comprimento médio de 5µm (FIGURA 3B) (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970; FALCÃO MORAIS, 1982).

O primeiro isolamento de *Z. mobilis* foi atribuído a Backer e Hillier, em 1911, quando estudavam a “doença da Cidra”. Por falta de um binômio latino para a bactéria, a descrição desses pesquisadores não foi validada (FALCÃO MORAIS, 1982).

Em 1924, Lindner isolou *Z. mobilis* do “aguamiel”, seiva doce de algumas espécies de *Agave* abundante no México e a denominou de *Termobacterium mobili*. Esta espécie de planta era utilizada na produção de uma bebida chamada pulque mexicano, referido por Clavigero como produto medicinal usado pelos astecas, como agente terapêutico eficaz contra distúrbios intestinais. Posteriormente, essa bactéria foi denominada de *Z. mobilis* por Kluyver & Niel em 1936 (GONÇALVES LIMA et al., 1970; MAGALHÃES NETO et al, 1958). Atualmente, aceita-se a classificação proposta por Swings & De Ley (1977) que reconhece o gênero *Z. mobilis* subsp. *mobilis* e *Z. mobilis* subsp. *pomacii* (FALCÃO MORAIS, 1982).

Z. mobilis tem sido isolada em diversos tipos de bebidas açucaradas: vinhos de maçã e de pêra, na Europa; cerveja deteriorada, nas Ilhas Britânicas; seiva de palmas diversas, na África, Ásia e Américas, e caldo de cana fermentado, no Brasil (FALCÃO-MORAIS, 1982/1983).

Em meio líquido, seu crescimento é observado pela alta densidade celular dispersa ou pelo sedimento flocoso. Crescem em temperatura que variam entre 25 a 42°C e em pH de 3,5 a 7,9. Em meio sólido, caracterizam-se pelo lento crescimento e por apresentarem colônias convexas, creme ou esbranquiçadas com 1 ou 2 mm de diâmetro após 48h a 30°C (FIGURA 3A) (SWINGS; DE LEY, 1977; HOLT et al, 1994).

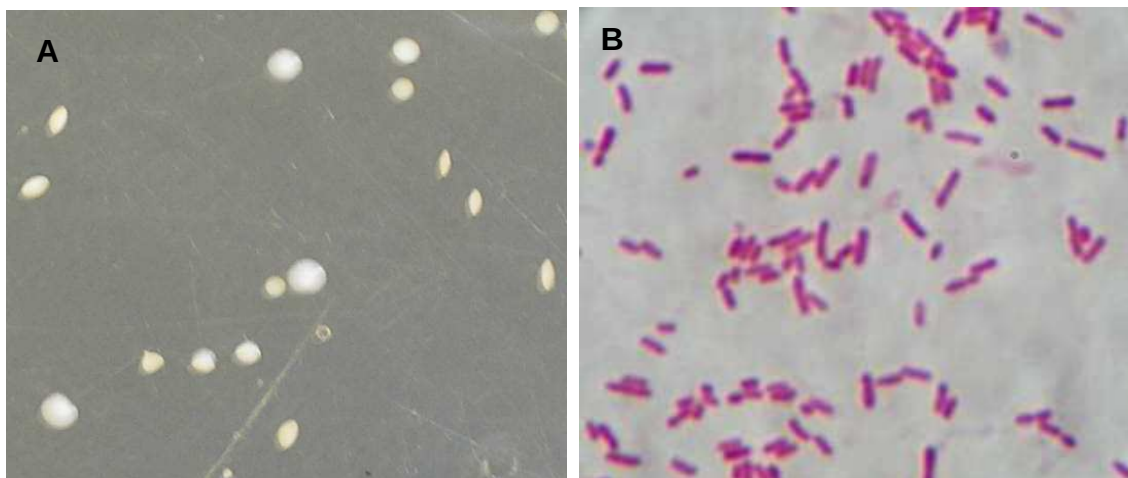


FIGURA 3: Aspecto macroscópico das colônias (A) e microscópico (1000 x) (B) de *Zymomonas mobilis*

Após 2 dias de incubação, a glicose presente no meio é fermentada por completo, produzindo etanol, CO₂ e uma pequena quantidade de ácido lático. Traços de acetaldeído também são detectados e ácido succínico só está presente quando há extrato de levedura no meio (SWINGS; DE LEY, 1977).

O estudo bioquímico deste microrganismo foi iniciado por Kluyver & Hoppenbrowers em 1931 (MAGALHÃES NETO et al., 1958). A principal característica bioquímica do gênero *Zymomonas* é sua capacidade de produzir etanol e CO₂ partir de glicose, frutose e sacarose (SWINGS; DE LEY, 1977). Além disso, ela é capaz de produzir, simultaneamente, fermentação alcoólica e láctica (GONÇALVES LIMA, 1968).

O mecanismo de formação do etanol foi assunto de uma série de trabalhos de Gibbs e Moss e, segundo esses autores, a conversão da glicose em anidrido carbônico e etanol é feita por um mecanismo diferente, pelo menos em parte, do esquema glicolítico clássico de Embden-Meyrhoff-Parnas, admitindo uma via semelhante à descrita por Entner & Doudoroff (1952) para *Pseudomonas saccharophila*, apesar desta via ser característica de microrganismos restritamente aeróbios (MAGALHÃES-NETO, 1958).

O rendimento e a produção de etanol por *Z. mobilis* têm sido discutido em diversos trabalhos, e são comparáveis ao que se obtém com as leveduras. Segundo, Kalnenieks (2006) esta produção é de 3 a 5 vezes mais rápida do que a observada pelas

leveduras. O crescimento celular não é dependente do consumo de açúcar, o que pode ser útil em fermentação contínua (FALCÃO-MORAIS, 1982).

Trabalhos realizados por Gonçalves Lima et al. (1968), mostraram a ação antagonista relevante de *Z. mobilis* contra *Proteus morgani*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus citreus*, *Neisseria catarrhalis*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus brevis* e contra algumas espécies de fungos, como *Aspergillus niger*.

Jales et al. (1999) e Vasconcelos (2002) observaram quantitativamente o efeito antimicrobiano da cultura e do liófilo de *Z. mobilis* sobre *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente.

Wanick & Da Silva (1971), mostraram que pacientes portadoras de *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans* foram curadas depois de 6 a 15 dias de tratamento com *Z. mobilis* na forma líquida e de geléia.

Souza & Souza (1973) observaram que o tratamento de colpites e vulvovaginites com *Z. mobilis* foi eficaz contra patógenos como *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Staphylococcus spp.*

Em 1997, Bacelar avaliou a ação da cultura de *Z. mobilis* na inibição do desenvolvimento da peritonite em camundongos, bloqueando a formação de abscessos e mortalidade, obtendo uma redução da mortalidade de 60% para 33%.

Segundo Lopes et al. (1980) 100% dos pacientes tratados com *Z. mobilis* tiveram o desaparecimento dos sinais e sintomas de enterocolites bacterianas, como também a erradicação da bactéria patogênica e normobiose da flora intestinal. Em pesquisas realizadas por Rocha (2003), a cultura liofilizada de *Z. mobilis* mostrou atividade inibitória frente *Escherichia coli* produtoras de β -lactamase nas primeiras horas de contato e, segundo a autora, esta atividade aumentou com o tempo de contato.

Em trabalhos realizados por Santos et al. (2004), houve uma redução da quantidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, em camundongos infectados, após tratamento oral com cultura de *Z. mobilis*, bem como um aumento dos níveis de interferon gama (INF γ) e do fator de necrose tumoral (TNF α) no sangue de dez camundongos saudáveis, após estimulação com essa mesma cultura.

Calazans et al., 2000 observou que a levana, polímero de frutose, produzida por diferentes linhagens de *Zymomonas* apresentavam ação antitumoral que variava com o peso molecular do polissacarídeo.

Azerêdo (2004) em seu trabalho realizado com ingestão oral de *Z. mobilis* UFPEDA 202 em ratos Wistar concluiu que a mesma se comportou como uma bactéria não patogênica e não tóxica, quando testada em ratos Wistar. Este resultado nos motivou a estudar uma linhagem diferente da utilizada pela autora em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Selecionar e caracterizar linhagens de *Zymomonas mobilis* com perfil probiótico.

3.2 Específicos

Selecionar linhagens de *Z. mobilis* com atividade antagônica sobre microrganismos de patogenicidade reconhecida;

Avaliar a tolerância de *Z. mobilis* a ser selecionada ao meio contendo diferentes valores de pH e diferentes concentrações de bile;

Determinar a suscetibilidade de uma cepa de *Z. mobilis* a ser selecionada frente a antimicrobianos;

Verificar a atividade antagônica de *Z. mobilis* em três diferentes concentrações de inóculo sobre *Escherichia coli* O157:H7 ou *Escherichia coli* ATCC 8739 ao longo de 24 horas;

Mensurar o pH da cultura *Z. mobilis*, *Escherichia coli* e da co-cultura *Z. mobilis*-*E. coli* ao longo de 24 horas;

Avaliar uma possível translocação de *Z. mobilis* da mucosa intestinal para a corrente sanguínea;

Avaliar as possíveis alterações morfológicas de órgãos vitais (fígado, baço, rim e intestino) de camundongos após ingestão da cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 355 durante 7 dias consecutivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

Para este estudo foram utilizadas dez cepas de *Z. mobilis*, catalogadas na Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos como: UFPEDA 199, UFPEDA 200, UFPEDA 201, UFPEDA 202, UFPEDA 204, UFPEDA 208, UFPEDA 355, UFPEDA 356, UFPEDA 358, Z297. Estas culturas foram gentilmente cedidas pelo Prof.º José Otamar Falcão de Moraes que as isolou durante o processo fermentativo para produção de etanol e as identificou. A tabela 1 mostra a origem e o ano de isolamento destas cepas.

A atividade antagônica das dez cepas de *Z. mobilis* foi avaliada contra um grupo de bactérias multirresistentes: *Enterococcus faecalis* (IC 068, IC 144, IC 245, IC 295, IC 56288, IC 56354, IC 55671, IC 55915, IC 55995); *Escherichia coli* IC 18; *Staphylococcus aureus* (13, 14, 15, IC 27, IC 138, IC 311, IC 404) e *Pseudomonas aeruginosa* (IC 01, IC 02, IC 03, IC 10, IC 12, IC 13, IC 14, IC 16, UFPEDA 39). Os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos destes microrganismos foram previamente determinados e estão apresentados na tabela 2. *Escherichia coli* O157:H7 foi proveniente da FIOCRUZ –RJ (Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro); *Escherichia coli* 1 IA foi isolada do queijo tipo coalho; quatro sorotipos de *Salmonella* foram provenientes do Laboratório Central do Estado de Pernambuco (LACEN-PE).

Sete microrganismos de coleção representantes de cada gênero bacteriano estudado: *Enterococcus faecalis* ATCC 27212; *Escherichia coli* ATCC 8735; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028 (ATCC-microrganismos pertencentes a American Type Culture Collection), e *Salmonella*

enterica UFPEDA 415 (UFPEDA-microrganismos pertencente à Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco). Também foram utilizadas onze cepas de *Candida albicans* isoladas de espécimes clínicos (TABELA 2). As bactérias e leveduras foram mantidas em ágar inclinado de Mueller-Hinton ou Sabouraud, respectivamente e foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.1.2 Animais

Foram utilizados 12 camundongos *swiss*, do sexo masculino, da linhagem *Mus musculo*, com ± 60 dias de idade, pesando aproximadamente 25g, desmamados aos 21 dias, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em número de 6 por gaiola, à temperatura de 22 ± 2 °C, sob condições padrão de iluminação (ciclo claro-escuro de 12/12 horas), tendo livre acesso à água e ração LABINA®. Os procedimentos adotados no manejo dos animais foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo “National Institute Guide for Care and Use of Laboratory Animals” e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE nº23076.005814/2008-18 (ANEXO).

Os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo controle (n=6): formado por camundongos que receberam, por gavagem, 0,3 mL de água diariamente (3 vezes ao dia por 7 dias consecutivos);
- Grupo tratado (n=6): composto por animais que receberam também por gavagem, 3 vezes ao dia por 7 dias consecutivos, 0,3 mL da cultura de *Zymomonas mobilis* na concentração de 10^9 UFC/mL.

TABELA 1: Origem e ano do isolamento das linhagens de *Zymomonas mobilis*

Linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i>	Origem		
	Substrato do Isolamento	Ano	Local
UFPEDA 199	Caldo de cana picado	1970	Recife
UFPEDA 200	Caldo de cana picado	1970	Recife
UFPEDA 201	Caldo de cana picado	1970	Recife
UFPEDA 202	Caldo de cana picado	1970	Recife
UFPEDA 208	Caldo de cana	1981	Usina Bulhões, Jaboatão, PE
UFPEDA 355	Caldo de cana	1987	Engenho de Alagoas, AL
UFPEDA 356	Caldo de cana	1988	Vicência, PE
UFPEDA 204	Caldo de cana	1980	Usina não identificada, SP
UFPEDA 358	Caldo de cana com melaço em fermentação	1988	Usina Cruangi, Timbaúba, PE
Z297	Caldo de cana	1997	Destilaria Miriri, Santa Rita, PB

UFPEDA: Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

TABELA 2: Origem e perfil de suscetibilidade dos microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos

Microrganismos	Origem	Resistência	Sensibilidade
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 00068	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 00144	Urina	CLO; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55245	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55295	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 56288	Urina	CLO; GEN; TET; ATM; AMP	TEIC; VAN
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 56354	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55671	Urina	CLO; GEN; TET; ATM	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55915	Urina	ND	TEIC
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55995	Urina	CLO; ERI; TET; ATM	TEIC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP; CPM; TOB; NIT; ATM
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 INCQS 0071	FIOCRUZ-RJ	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP; CPM; TOB; NIT; ATM
<i>Escherichia coli</i> 1 IA	Isolada de alimento	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> IC 18	Urina	AMP; CFO	CTX
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	ATCC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> UFPEDA 415	Coleção de microrganismos da UFPEDA	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Rubislaw 3373	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Saintpaul 391	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Anatum P-58	Isolado do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Anatum 873	IC	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> 13	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> 14	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 15	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 27	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 138	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 311	Ferida do dedo	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 404	Secreção da orofaringe	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; ERI; TET	CIP

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 01	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 02	Secreção hepática	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 03	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 10	Secreção abdominal	CIP; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; TOB; ATM; IMP; MER	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 12	Urina	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 13	Urina	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 14	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 16	Hemocultura	GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; IMP; MER; SZT; AMP- SUB; ATM	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 39	Coleção de microrganismos da UFPEDA	ND	ND
<i>Candida albicans</i> IC 01	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 03	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 07	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 08	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 09	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 11	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 12	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 16	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 17	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 19	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>Candida albicans</i> IC 22	Cavidade oral	ND	Miconazol

AMI: Amicacina 30 µg; AMOX: Amoxicilina 10 µg; AMP: Ampicilina 10 µg; AMP-SUB: Ampicilina/Subactam 10 µg/10 µg; ATM: Aztreonam 30 µg; AZI: Azitromicina 15 µg; CFL: Cefalotina 30 µg; CFO: Cefoxitina 30 µg; CIP: Ciprrofloxacin 5 µg; CLO: Cloranfenicol 30 µg; CPM: Cefepime 30 µg; CTX: Cefotaxima 30 µg; ERI: Eritromicina 15 µg; GAT: Gatifloxacin 10 µg; GEN: Gentamicina 10 µg; NAL: Ácido Nalidíxico 30 µg; NIT: Nitrofurantoína 30 µg; NOR: Norfloxacin 10 µg; PEN = Penicilina G 10 UI; IPM: Imipenem 10 µg; MER: Meropenem 10 µg; TEIC: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; TOB: Tobramicina 10 µg; SZT: Sulfazotrim 25 µg; VAN: Vancomicina 30 µg; ATCC: American Type Culture Collection; FIOCRUZ-RJ: Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro; IC: Isolado clínico; IA: Isolada de alimento; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ND: Não determinado; UFPEDA: Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de Antibióticos.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Manutenção da cultura de *Zymomonas mobilis*

As culturas de *Z. mobilis* foram mantidas em meio Standard Swings e De Ley (SSDL), com a seguinte composição em g/L: glicose 20,0; extrato de levedura 5,0. O pH deste meio foi ajustado antes da autoclavagem para 6,5 (SWINGS & DE LEY, 1977).

Subcultivos de *Z. mobilis* foram realizados mensalmente em meio líquido de SSDL e incubados a 35°C durante 48 horas, em seguida estas culturas foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.2.2 Pré-fermentação e fermentação

A pré-fermentação foi realizada em meio SSDL (SWINGS & DE LEY, 1977), cuja composição em g/L é: glicose 20,0 e extrato de levedura 1,0 (pH 7,2). As soluções desses sais foram preparadas separadamente e autoclavadas a 120°C por 15 minutos. Em seguida estas soluções foram misturadas e o pH aferido (MAGALHÃES NETO et al, 1958; LOPES et al, 1980). O inóculo para a pré-fermentação foi concentrado pela centrifugação de 90mL de uma cultura incubada por 18 horas em meio SSDL. Esta centrifugação ocorreu a 4.000 rpm, e a 4°C durante 30 minutos.

A fermentação foi iniciada pela transferência da cultura de pré-fermentação para o meio SSDL, numa proporção que representa 10% (v/v) do volume inicial de fermentação. A partir desta transferência foi iniciada a fermentação que durou 18 horas.

4.2.3 Enumeração das unidades formadoras de colônias

Após 18 horas de fermentação, uma alíquota de meio mililitro da cultura de *Z. mobilis* foi diluída de forma seriada e plaqueada sobre o meio SSDL. As placas semeadas foram incubadas durante 24 horas a 30°C. Após esta incubação, foi realizada a enumeração das células viáveis.

4.2.4 Teste de pureza

As culturas de *Z. mobilis* em meio SSDL foram semeadas em meio Saboraud e Mueller-Hinton para detectar uma possível contaminação de fungos ou bactérias, respectivamente.

4.2.5 Seleção e avaliação da atividade antagônica de diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* frente a microrganismos patogênicos

A seleção e avaliação da atividade antagônica de *Z. mobilis* frente a microrganismos patogênicos foram determinadas segundo o método “agar spot test” descrito por Schillinger & Lucke (1989), e está esquematizado na figura 4. Para esta avaliação foram utilizados 49 microrganismos-teste, sendo 10 cepas de *Enterococcus faecalis*, 8 de *Staphylococcus aureus*, 4 de *Escherichia coli*, 10 de *Pseudomonas aeruginosa*, 6 de *Salmonella enterica*, 11 de *Candida albicans*. Alguns destes microrganismos apresentaram fenótipo de resistência a vários antimicrobianos (TABELA 2). Esta avaliação foi realizada com cepas de *Z. mobilis* previamente descritas no item 4.1.1.

Das culturas de *Z. mobilis*, uma alíquota de 10 µL contendo 10^9 UFC/mL foram semeados em placas contendo 8 mL de ágar SSDL e incubadas a 30°C por 48 horas. Em cada placa foram semeadas de 3 a 4 linhagens de *Z. mobilis*. Após a incubação, 1 mL da cultura do microrganismo-teste padronizada em 10^7 UFC/mL foi incorporado a 9 mL de

meio semi-sólido de Mueller-Hinton ou de Sabouraud e vertidos sobre as placas previamente semeadas.

As placas foram homogeneizadas, colocadas em superfície plana até total solidificação e incubadas a 30°C, durante 24 horas. As leituras foram efetuadas utilizando uma régua calibrada em milímetro medindo-se o diâmetro do halo de inibição em torno do crescimento de *Z. mobilis*. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

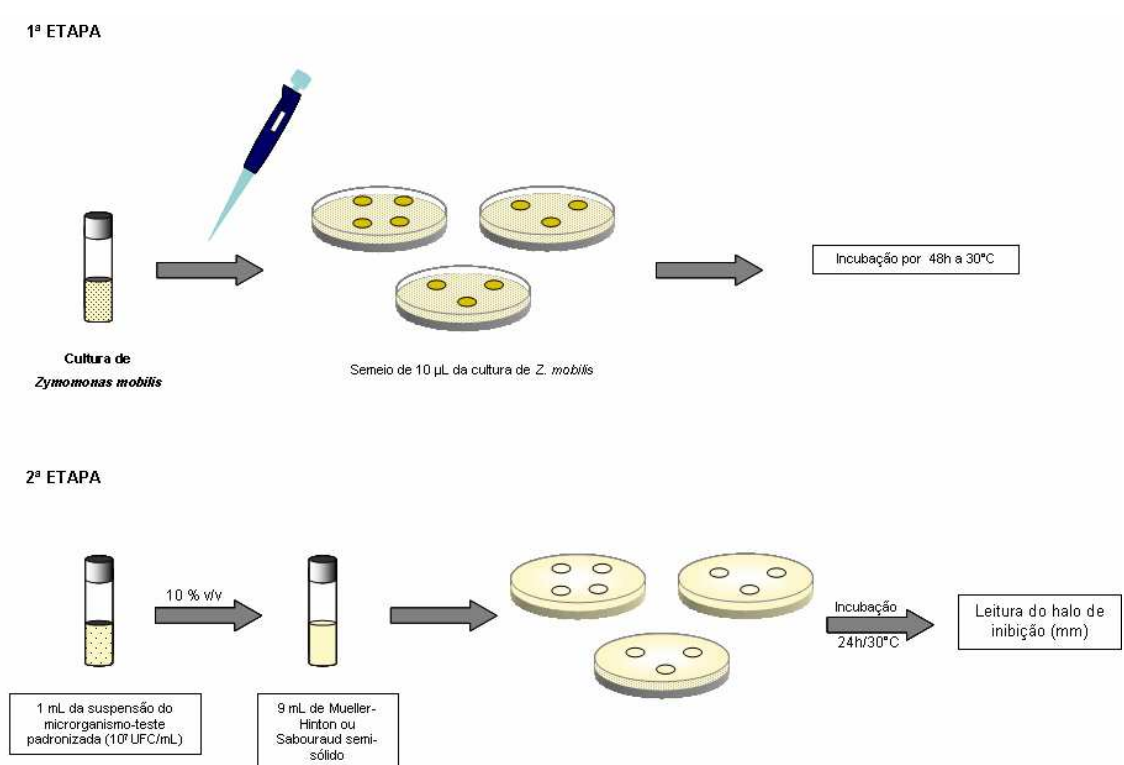


FIGURA 4: Esquema da avaliação da atividade antagônica de *Zymomonas mobilis* frente seis diferentes tipos de patógenos.

4.2.6 Avaliação da tolerância da cultura de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 frente a diferentes valores de pH

A linhagem de *Z. mobilis* UFPEDA 355 foi escolhida para dar continuidade a este trabalho com base no índice de crescimento específico em meio líquido de SSDL cujo valor foi o mais alto quando comparado as demais linhagens estudadas (dados não publicados).

A avaliação da tolerância ao ácido clorídrico das culturas de *Z. mobilis* UFPEDA 355 foi determinada segundo o método descrito por Jacobsen et al. (1999), e está esquematizada na figura 5.

Para esta avaliação, o pH do meio líquido SSDL foi previamente ajustado com ácido clorídrico 1N. Dessa forma, foi obtida uma série de tubos com meio SSDL cujo pH fora ajustado para 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0.

Um mililitro da cultura de *Z. mobilis* contendo 10^{10} UFC/mL, foi posto em contato por 4 horas a 30°C com 9 mL do meio líquido de SSDL acidificado. Após a incubação, uma alíquota de 0,5 mL de cada cultura foi diluída seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} e um mililitro de cada uma das diluições foi incorporado a 9 mL de meio semi-sólido de SSDL e vertidos sobre uma placa contendo 8 mL de meio sólido de SSDL. As placas foram homogeneizadas, colocadas em superfície plana até total solidificação e incubadas a 30°C, durante 48 horas. A leitura foi realizada pela enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC) de cada uma das culturas de *Z. mobilis*.

O tempo de 4 horas foi estabelecido de acordo com pesquisas realizadas por Charteris et al. (1998), onde foi elaborada uma metodologia para avaliar a sobrevivência de microrganismos probióticos no trato gastrointestinal. Segundo os autores, esse é o tempo necessário para o microrganismo chegar ao intestino delgado.

4.2.7 Avaliação da tolerância da cultura de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 à bile bovina

A tolerância da cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 355 à bile bovina foi determinada pelo método descrito por Jacobsen et al. (1999), e está esquematizada na figura 5.

A bile bovina foi pesada e solubilizada em água destilada de modo a obter soluções com concentrações de 40%; 30%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; e 1,25% p/v. Estas soluções foram autoclavadas a 121°C, por 15 minutos. Um mililitro de cada uma das diluições foi posto em contato, por 4 horas a 30°C, com 9 mL da cultura de *Z. mobilis* em meio líquido de SSDL por 24 horas de incubação.

Após o contato, as culturas foram diluídas seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} e um mililitro de cada uma das diluições foi incorporado a 9 mL de meio semi-sólido de SSDL. Em seguida, este conteúdo foi vertido sobre placas que continham 8 mL do meio sólido de SSDL. Estas placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas. A leitura foi realizada após incubação, pela enumeração das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) de *Z. mobilis*.

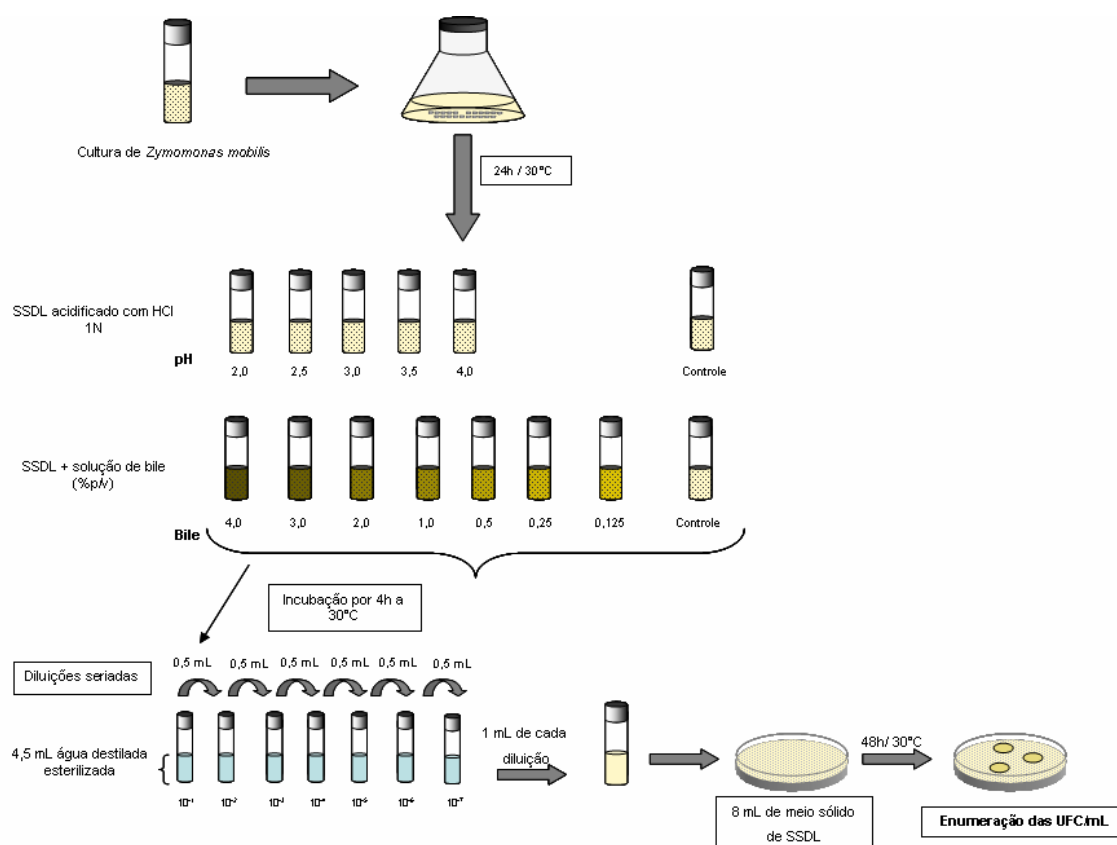


FIGURA 5: Esquema prático para avaliação da ácido-bile tolerância de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355.

4.2.8 Determinação *in vitro* da suscetibilidade de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 aos antimicrobianos

A susceptibilidade de *Z. mobilis* UFPEDA 355 a dez antimicrobianos foi realizada pela técnica descrita por Bauer & Kirby (1966) modificada preconizada pelo CLSI, e está esquematizada na figura 6. Esta técnica baseia-se na inibição do crescimento de um microrganismo na superfície do meio de cultura inoculado, ao redor de um disco de papel filtro impregnado com uma determinada droga. Este método informa se o microrganismo é sensível ou resistente a um determinado antibiótico ou quimioterápico numa concentração conhecida (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI, 2003).

Os antimicrobianos utilizados foram obtidos do fabricante CECON (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico LTDA- São Paulo-SP): Eritromicina (ERI-15 µg); Cefoxitina (CFO -30 µg); Azitromicina (AZI -15 µg); Ofloxacina (OFX -5 µg); Sulfazotrim (SUT -25 µg); Imipenem (IPM -10 µg); Cbranfenicol (CLO -30 µg); Ácido clavulânico/ Amoxicilina (AMC -30 µg); Amicacina (AMI -30 µg); Ampicilina (AMP -10 µg).

O meio foi preparado segundo as instruções dos seus fabricantes (BIOBRÁS e VETEC) e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir da cultura de 24 horas de *Z. mobilis*, incubada a 30°C em meio líquido de SSDL. A cultura bacteriana foi diluída em água destilada e calibrada em 10⁹ UFC/mL. Em seguida, um mililitro desta suspensão foi incorporado a 9 mL de meio semi-sólido de SSDL e este conteúdo foi vertido sobre placas de 60 mm que continham 8 mL do meio sólido de SSDL. Discos de papel contendo os antimicrobianos foram depositados na superfície do meio sólido de SSDL previamente semeado. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas. As leituras foram efetuadas utilizando uma régua calibrada em milímetro medindo-se o diâmetro do halo de inibição em torno do disco. O critério de interpretação foi o mesmo descrito para os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* preconizado pelo CLSI (2003).

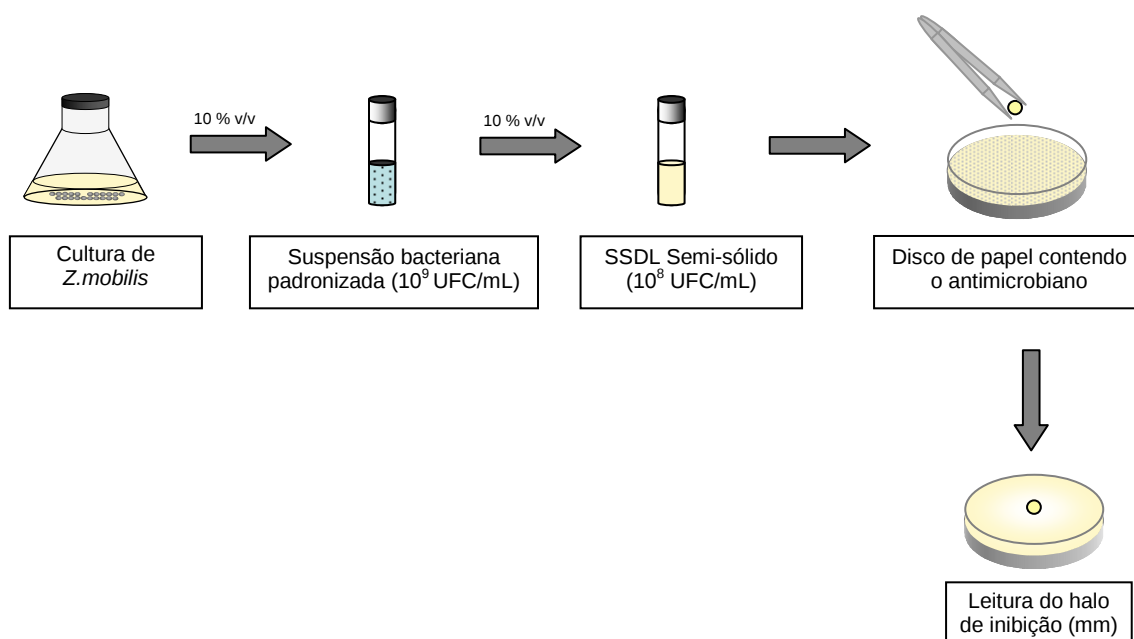


FIGURA 6: Esquema prático para a determinação *in vitro* da suscetibilidade de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 aos antimicrobianos.

4.2.9 Influência da concentração celular de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 sobre sua atividade antagônica frente a *Escherichia coli* O157:H7 ou *Escherichia coli* ATCC 8739

Nesta determinação, 50 mL da cultura de *Z. mobilis* padronizada em 10^9 ou 10^8 ou 10^7 UFC/mL foi adicionada à cultura de *Escherichia coli* O157:H7 ou *Escherichia coli* ATCC 8739 padronizada em 10^6 UFC/mL numa proporção de 1:1 mL.

A enumeração das células viáveis de *Escherichia coli* ao longo das 24 horas de contato foi realizada após diluições, seguida de plaqueamento em meio sólido de Mueller-Hinton e incubação a 37°C por 24 horas. Uma enumeração para a cultura controle de *E. coli* e para *Z. mobilis* também foram realizadas (FIGURA 7).

Estes procedimentos foram repetidos a cada 3 horas até as 12 horas e após 24 horas de contato. Nestes mesmos intervalos foram retiradas destas culturas alíquotas de 5 mL para aferição do pH.

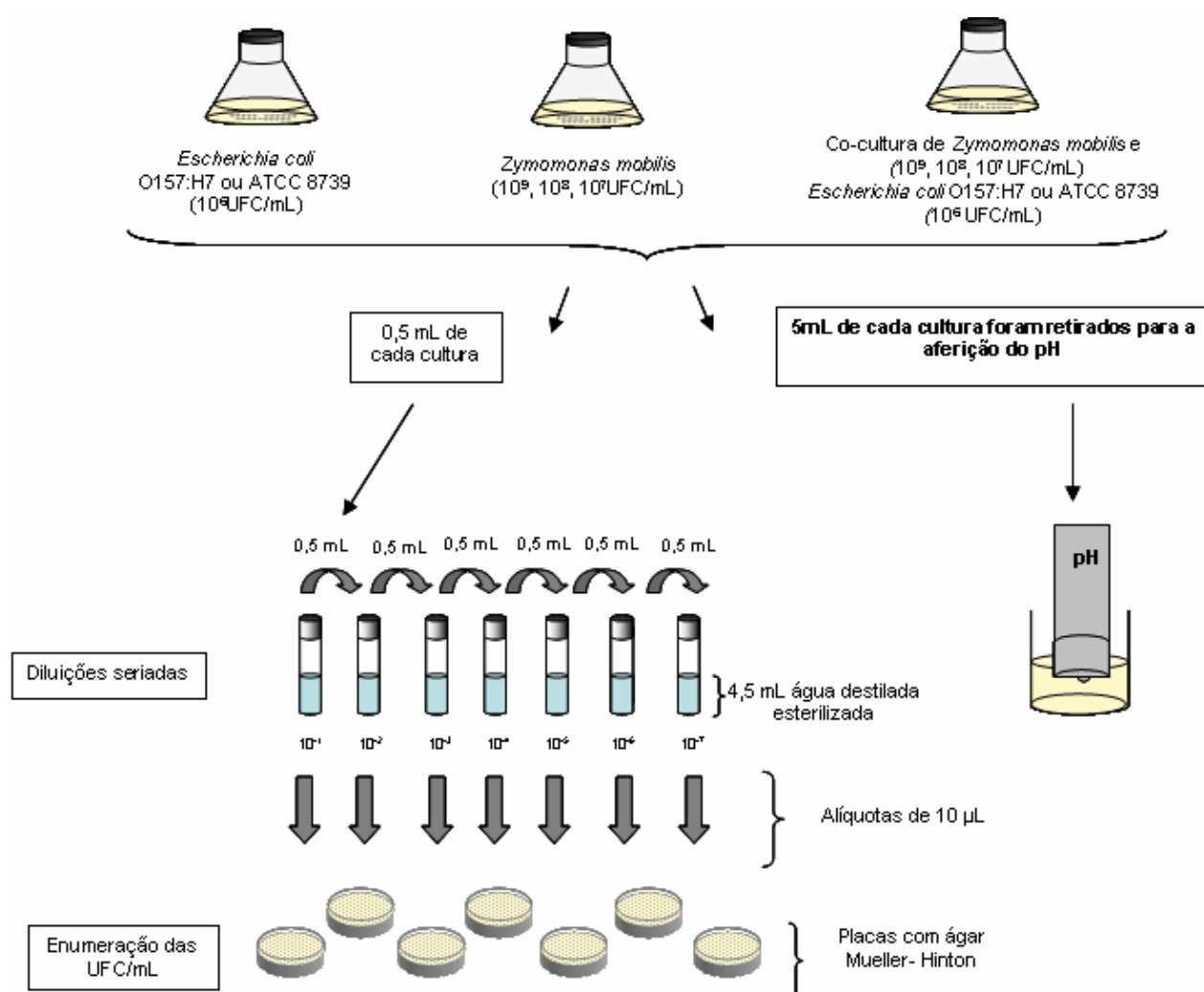


FIGURA 7: Esquema para determinação da atividade antagonista de diferentes concentrações de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 frente *Escherichia coli* O157:H7 e *Escherichia coli* ATCC 8739

4.2.10 Determinação de uma possível translocação de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 da mucosa intestinal dos camundongos para a corrente sanguínea

Os animais foram anestesiados com tiopental (0,2mL/10g do animal), administrado por via intraperitoneal. Assepsia do tórax com polivinilpirrolidona foi realizada e em seguida, aproximadamente 1 mL do sangue foi coletado através de punção cardíaca. O sangue foi cultivado em meio líquido de BHI (Brain Heart Infusion) por 24 horas a 37°C. Após incubação, estas culturas foram semeadas sobre os meios; ágar MacConkey, para isolamento de microrganismos Gram-negativos e em ágar sangue para outros microrganismos ou fungos. Estes semeios foram repetidos 48 horas após a incubação destas culturas.

4.2.11 Avaliação histológica do fígado, baço, rins e intestino de camundongos após ingestão da cultura de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada do baço, fígado, rins e intestinos. Os órgãos foram lavados em solução salina a 0,9% esterilizada, cortes transversais foram realizados nos órgãos, de modo a facilitar a penetração da substância fixadora de Carnoy. Após a fixação, por aproximadamente 1 hora, foram obtidos três fragmentos de cada órgão, medindo em torno de 0,5cm de espessura, de três regiões distintas. Esses fragmentos foram submetidos à rotina histológica: desidratação; diafanização, impregnação em parafina, inclusão em blocos de parafina, execução da microtomia, secagem e colagem dos cortes, desparafinização das preparações histológicas, hidratação em sucessivos banhos de proporções decrescentes de alcoóis, segregação e coloração das lâminas pela hematoxilina-eosina (HE), desidratação, clarificação e montagem das preparações com resina e lamínula (ANEXO).

Em seguida, a leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 40 e 100 vezes. O objetivo foi observar as possíveis alterações morfológicas das células e tecidos.

4.2.12 Análise estatística

Cálculos estatísticos foram utilizados para descrição do comportamento individual das variáveis em estudo (médias e desvios padrão) e para a comparação entre as médias das amostras independentes foi utilizado o teste t de Student, cujo nível de significância foi de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antagônica de diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* frente a microrganismos patogênicos

Os resultados da atividade antagônica das linhagens de *Z. mobilis* estão apresentados na tabela 3 e na figura 8.

As linhagens de *Z. mobilis* avaliadas quanto às suas atividades antagônicas, tiveram poder inibitório sobre o crescimento de microrganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus* e Gram negativos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* de diferentes sorotipos. O intervalo dos valores do diâmetro dos halos de inibição para os microrganismos ensaiados ficou situado entre $19,5 \pm 4,6$ e $24,3 \pm 8,3$. Entretanto, estas linhagens não apresentaram atividade sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Z. mobilis UFPEDA 199 e UFPEDA 201 foram as linhagens mais ativas sobre o crescimento dos microrganismos testes e não foram observadas diferenças significativas entre seus antagonismos $p < 0,05$. Enquanto que a linhagem Z297 foi a que apresentou o menor efeito inibitório, quando comparada as duas primeiras cepas ($p < 0,05$).

Quando foram analisados os resultados do antagonismo de *Z. mobilis* UFPEDA 201 frente ao conjunto de microrganismos ensaiados foi constatado que *Staphylococcus aureus* 311, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* IC 10 apresentaram maior sensibilidade quando comparada aos demais microrganismos e que os valores dos halos de inibição obtidos com a cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 201 para estes gêneros não diferiram estatisticamente $p < 0,05$.

As amostras de *Salmonella* foram mais sensíveis à ação da linhagem UFPEDA 202 de *Z. mobilis*, quando comparada as outras linhagens. Das amostras ensaiadas, *Salmonella enterica* Anatum P-58 mostrou ser a mais sensível e a *S. enterica* Anatum 873 a mais resistente cujos valores dos halos de inibição foram da ordem de $24,3 \text{ mm} \pm 7,0$ e $14,4 \text{ mm} \pm 5,8$, respectivamente.

Das bactérias utilizadas neste estudo, *Pseudomonas aeruginosa* foi a que apresentou maior sensibilidade à ação dos metabólitos de *Z. mobilis* e foi seguida por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. Estatisticamente não houve diferença significativa ($p < 0,05$) da sensibilidade destes gêneros a ação de *Z. mobilis*.

Nossos resultados estão de acordo com estudos realizados por Teixeira (2005), que realizou um estudo sobre a atividade antagônica de *Z. mobilis* UFPEDA 202 sobre diversos sorotipos de *Salmonella* e realizada pela técnica das cinéticas bactericida (Time Killing Curves Methods). Segundo a autora, todos os sorotipos de *Salmonella* aqui estudados mostraram-se sensíveis à atividade antagônica de *Z. mobilis* UFPEDA 202 e o sorotipo Anatum 873 foi o que apresentou menor sensibilidade.

Em relação à atividade antagônica de *Z. mobilis* sobre *S. aureus*, nossos resultados foram melhores do que os encontrados por Dabés et al. (2001) e Martins et al. (2006). O primeiro analisando a atividade das bactérias ácido lácticas isoladas de produtos cárneos encontrou que 13,5% destas inibiam o crescimento de *S. aureus*. O segundo demonstrou que 75% das bactérias ácido-láticas isoladas de fezes de suínos possuíam atividade antagônica sobre *S. aureus* ATCC 6538, que foi a mesma cepa utilizada em nosso estudo. Ambas pesquisas foram realizados de forma semelhante às nossas.

Em pesquisas realizadas por Freitas (2001), foi observado que *Z. mobilis* demonstrou atividade inibitória significativa frente *Staphylococcus aureus* obtidos de isolados clínicos e esta inibição foi proporcional ao tempo de incubação. Jales et al (1999) observaram quantitativamente efeito inibitório da cultura e do liófilo de *Z. mobilis* sobre *Staphylococcus aureus*.

Z. mobilis não apresentou atividade antagônica frente *Candida albicans*. Este resultado está de acordo com os apresentados recentemente por Köll et al. (2008) que ao estudar atividade antagônica de 22 cepas *Lactobacillus* isolados da cavidade oral de humanos frente *Candida albicans*, concluiu que nenhuma das cepas testadas fora capaz de inibir o crescimento desta levedura. Tais resultados não corroboram com os de Vasconcelos (2002), que observou o efeito inibitório da cultura e do liófilo de *Z. mobilis* sobre *Candida albicans*, através da curva de crescimento fungicida de 0 a 48 horas de contato, neste trabalho todas as culturas foram padronizadas em 10^6 UFC/mL.

As melhores reduções do inóculo de *C. albicans* foram observadas após 9 horas de contato com a cultura e 24 horas para o liófilo.

Em nosso estudo, não foi observada também atividade antagônica de *Z. mobilis* frente *Enterococcus faecalis*. Este resultado contrasta com os encontrados por Martins et al. (2006), que em trabalho citado anteriormente verificou atividade de 75% das bactérias ácido lácticas possuíam atividade inibitória sobre *E. faecalis* ATCC 19433. Apesar de os halos de inibição terem sido os menores encontrados no estudo, entre 1 e 4 mm.

A atividade antagônica de bactérias probióticas deve-se em parte a capacidade que estes microrganismos têm de formar ácido láctico e ácido acético a partir de carboidratos, promovendo a redução do pH do meio inibindo, conseqüentemente, o crescimento de microrganismos patógenos (LEE & SALMINEN, 1995). Outra importante característica destes microrganismos é a produção de bacteriocinas e peptídeos bacterianos que são peptídeos complexos ativos sintetizados nos ribossomos da célula bacteriana e que são lançados extracelularmente apresentando atividade bactericida ou bacteriostática (GARNEAU et al., 2002). Parâmetros como pH do meio, produção de bacteriocinas e compostos do metabolismo primário e secundário da cultura de *Z. mobilis* podem estar relacionadas à atividade antagônica desta bactéria sobre o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* e *P. aeruginosa* apresentada neste trabalho.

TABELA 3: Atividade antagonica de dez linhagens de *Zymomonas mobilis* frente diversas cepas de microrganismos patógenos

Microrganismos-teste	Linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> - valores dos halos de inibição (mm) – (X ± DP)									
	UFPEDA 199	UFPEDA 200	UFPEDA 201	UFPEDA 202	UFPEDA 204	UFPEDA 208	UFPEDA 355	UFPEDA 356	UFPEDA 358	UFPEDA Z297
<i>E. faecalis</i> (n=10)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>E. coli</i> (n=4)	29,6 ± 10,1	26,3 ± 4,2	30,0 ± 4,9	26,6 ± 6,3	16,0 ± 11,1	17,5 ± 12,6	13,8 ± 9,2	17,5 ± 12,6	13,0 ± 9,1	8,5 ± 9,8
<i>Salmonella</i> (n=6)	24,6 ± 6,7	22,6 ± 5,9	24,2 ± 7,3	24,7 ± 7,3	18,5 ± 5,0	19,2 ± 7,0	15,0 ± 7,4	17,7 ± 4,6	18,4 ± 2,8	10,4 ± 8,2
<i>S. aureus</i> (n=8)	28,6 ± 18,7	20,2 ± 13,6	30,9 ± 16,4	25,7 ± 14,6	15,7 ± 13,5	21,0 ± 13,8	18,7 ± 12,5	16,5 ± 14,3	14,2 ± 15,5	5,4 ± 10,2
<i>P. aeruginosa</i> (n=10)	34,1 ± 5,6	27,9 ± 7,0	36,7 ± 7,4	32,0 ± 7,8	20,5 ± 3,7	18,8 ± 3,6	16,2 ± 4,3	21,3 ± 5,3	24,5 ± 10,9	11,4 ± 10,3
<i>C. albicans</i> (n=11)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

ATCC: American Type Culture Collection

DP: Desvio padrão

IA: Isolada de alimento

IC: Isolado clínico

UFPEDA: Universidade Federal de Pernambuco-Departamento de Antibióticos

X: Média aritmética

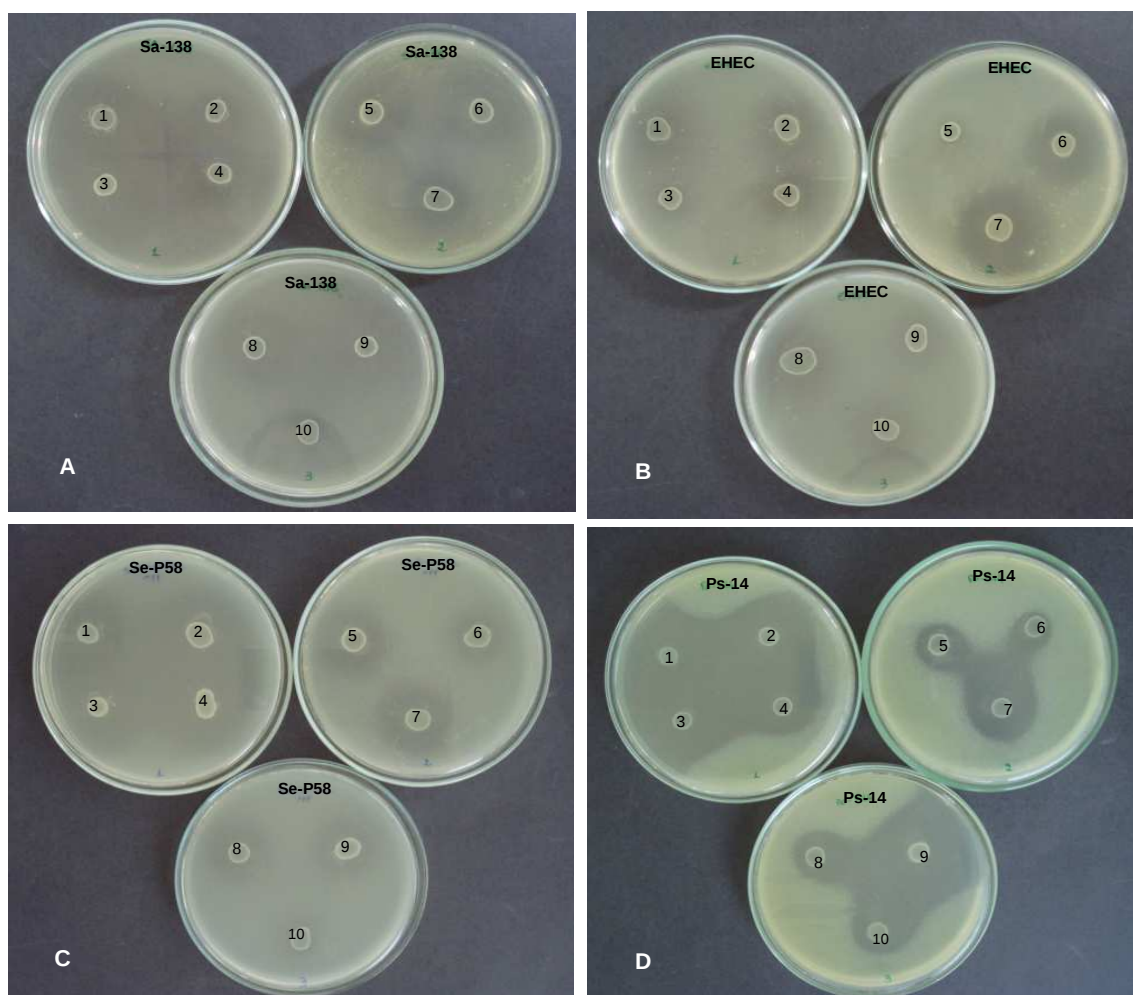


FIGURA 8: Atividade antagônica de 10 linhagens de *Z. mobilis* (1-UFPEDA 199, 2-UFPEDA 200, 3- UFPEDA 201, 4-UFPEDA 202, 5- UFPEDA 208, 6- UFPEDA 355, 7- UFPEDA 356, 8- UFPEDA 204, 9- UFPEDA 358, 10-Z297) frente a 4 dos 6 gêneros de microrganismos estudados: **A)** *Staphylococcus aureus* IC 138, **B)** *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) O157:H7, **C)** *Salmonella enterica* Anatum P 58, **D)** *Pseudomonas aeruginosa* IC 14.

5.2 Avaliação da viabilidade celular da cultura de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 em meio ácido

O efeito do pH sobre a viabilidade de *Z. mobilis* UFPEDA 355 está representado na tabela 4.

Após contato por 4 horas, a cultura de *Z. mobilis* mostrou-se sensível ao meio SSDL em pH 2,0 e tolerante aos em pH 2,5; 3,0. A partir do pH 3,5 foi observado crescimento atingindo uma concentração celular de $9,45 \pm 0,01$ log UFC/mL. Estes resultados corroboram aos de Cavalcanti (2004), que avaliou o perfil de tolerância de 13 cepas de *Z. mobilis* (UFPEDA 199, UFPEDA 200, UFPEDA 201, UFPEDA 202, UFPEDA 203, UFPEDA 204, UFPEDA 208, UFPEDA 353, UFPEDA 356, UFPEDA 386, , Z194, Z297, Z397) ao ácido clorídrico e verificou que 100% delas eram tolerantes em meio SSDL em pH 3,0.

Z. mobilis é capaz de crescer em valores de pH que variam entre 3,5 e 7,9. E segundo Swings e De Ley (1977), esta bactéria possui uma resistência natural a ambientes ácidos, sendo encontrada em bebidas fermentadas com valores de pH abaixo de 4, como vinho e a cidra.

Estudos correlacionam a tolerância de *Z. mobilis* aos altos níveis de etanol durante o processo fermentativo, à presença de hopanóides e do ácido cisvacênico na membrana celular, os quais protegem a bactéria dos efeitos tóxicos do etanol e da presença de ácidos orgânicos oriundos do seu metabolismo (BRINGER et al., 1985; HERMANS et al., 1991; MOREAU et al., 1997; SCHIMIDT et al., 1986).

Este ou um mecanismo análogo poderia estar relacionado à tolerância de *Z. mobilis* ao ácido clorídrico encontrada no presente estudo.

A resistência ao trânsito gastrointestinal constitui o mais importante critério de seleção para bactérias probióticas. Visto que o ambiente ácido do estômago e os sais biliares secretados no duodeno são os maiores empecilhos para a sobrevivência das bactérias ingeridas. Esses microrganismos precisam sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal para que possam competir com os prováveis patógenos presentes neste local (COLLADO; SANZ, 2006; HÜTT et al., 2006; MARTINS et al., 2006; SUCCI et al., 2005).

Embora as características mais importantes das bactérias probióticas sejam os seus efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro, que na realidade são o conjunto de propriedades fisiológicas e bioquímicas, a avaliação do comportamento tecnológico, como a tolerância à acidez, é muito importante na seleção de linhagens para aplicações alimentares (CHUNG et al., 1999; GUGLIELMOTTI et al., 2007).

Vernazza et al. (2006) estudaram a tolerância de várias cepas de *Bifidobacterium* a diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0) e obtiveram resultados concordantes com os nossos. Eles verificaram uma maior tolerância a valores iguais ou superiores ao pH 3. Segundo os autores, esta tolerância variou de acordo com a espécie avaliada.

Diversos são os trabalhos que descrevem o isolamento e determinam a viabilidade de microrganismos probióticos, principalmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* em ambientes acidificados. A variação do tempo de exposição destes microrganismos a um pH ácido influencia diretamente na viabilidade celular que é dependente também do microrganismo estudado (CHOU; WEIMER, 1999; DUNNE et al., 2001; JACOBSEN et al., 1999; PORCHAT et al., 1992).

TABELA 4: Viabilidade de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 em log₁₀ UFC/mL após 4 horas de contato em meio SSDL acidificado.

pH	Viabilidade celular de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 355 após 4h de contato Log ₁₀ UFC/mL (X ± DP)
2,0	0
2,5	5,42 ± 0,39*
3,0	8,62 ± 0,01*
3,5	9,38 ± 0,02
4,0	9,45 ± 0,01
Controle T ₀	9,21 ± 0,14
Controle T ₄	9,39 ± 0,31

X: Média aritmética

DP: Desvio-padrão

Controle T₀: Cultura controle no tempo inicialControle T₄: Cultura controle após 4 horas de incubação

*Houve diferença significativa, quando comparados ao controle (p < 0,05)

5.3 Avaliação da tolerância de *Z. mobilis* UFPEDA 355 à bile bovina

Os resultados da viabilidade de *Z. mobilis* UFPEDA 355 em meio contendo bile bovina estão apresentados na tabela 5.

Z. mobilis foi tolerante a todas as concentrações de bile bovina, presentes no meio SSDL. Na cultura contendo bile a 0,125 p/v não foi observado diferença significativa quando comparada aos controles no início do experimento e após quatro horas de incubação (p < 0,05).

A viabilidade celular da cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 355 aumentou com o decréscimo da concentração de bile bovina no meio.

Após o tempo de contato de 4 horas, nenhuma das concentrações ensaiadas foi capaz de inviabilizar totalmente a cultura de *Z. mobilis* e a cultura em SSDL contendo 4% p/v de bile foi capaz de diminuir 2,91 log₁₀ UFC/mL do inóculo original.

Em trabalho realizado por Cavalcanti (2004), 61,5% das treze cepas de *Z. mobilis* estudadas por ela também demonstraram tolerância a bile bovina numa concentração de 4% p/v.

Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram aos encontrados por Swings; De Ley (1977), que demonstraram um percentual de sobrevivência de 41 a 53% de *Z. mobilis* em meio contendo 1% e 1,5% de bile, respectivamente.

A tolerância à bile é uma importante característica para a seleção de microrganismos probióticos (JIN et al., 1998). A bile, que é produzida no fígado e atua no intestino delgado causando modificações na membrana celular da bactéria, afetando a permeabilidade celular, a viabilidade e suas interações entre a membrana e o ambiente (SUCCI et al., 2005). Por isso, é imprescindível selecionar bactérias probióticas capazes de tolerar os sais biliares e de chegarem vivas ao seu local de ação.

A resistência de microrganismos à bile está relacionada à presença de uma enzima responsável pela desconjugação dos sais biliares, denominada hidrolase, detectada em várias espécies endógenas de bactérias presentes no trato gastrointestinal como: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (BEGLEY et al., 2005; PEREIRA et al, 2003).

A análise genética desta enzima realizada no gênero *Bifidobacterium*, constatou que a tolerância à bile destes microrganismos deve-se não só a ação da enzima hidrolase como também a presença de algumas proteínas chamadas de transportadoras, que são transmembranares e compostas por vários resíduos hidrofóbicos. O mecanismo de ação dessas proteínas ainda é incerto, já que *Bifidobacterium* não são capazes de modificar quimicamente moléculas de ácidos biliares. Porém, sabe-se que a ação conjunta das duas proteínas contribui eficientemente para a tolerância destes à bile (KIM; LEE; 2008).

TABELA 5: Viabilidade celular de *Z. mobilis* UFPEDA 355 ($\log_{10}$ UFC/mL) após 4 horas com meio SSDL contendo diferentes concentrações de bile bovina.

Bile (p/v)	Viabilidade celular de <i>Z. mobilis</i>
	UFPEDA 355 $\log_{10}$ UFC/mL ($\bar{X} \pm DP$)
4,0	$6,87 \pm 0,24^*$
3,0	$7,09 \pm 0,02^*$
2,0	$7,32 \pm 0,02^*$
1,0	$7,34 \pm 0,06^*$
0,5	$7,38 \pm 0,08^*$
0,25	$8,09 \pm 0,13^*$
0,125	$9,79 \pm 0,15$
Controle T ₀	$9,64 \pm 0,03$
Controle T ₄	$9,78 \pm 0,00$

X: Média aritmética

DP: Desvio-padrão

Controle T₀: Cultura controle inicial

Controle T₄: Cultura controle após 4 horas de incubação

*Houve diferença significativa, quando comparados ao controle ($p < 0,05$)

5.4 Determinação da suscetibilidade de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 a diversos antimicrobianos

Os resultados da suscetibilidade de *Z. mobilis* UFPEDA 355 estão apresentados na tabela 6 e na figura 9.

Z. mobilis demonstrou resistência à Ofloxacina, Amicacina, Ampicilina e sensibilidade aos demais antimicrobianos ensaiados.

Imipenem foi o antimicrobiano mais efetivo sobre o crescimento de *Z. mobilis* cujo halo de inibição foi igual a $38,3 \pm 1,52$.

Fernandes e Azevedo-Ximenes (2007) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram a resistência de dez cepas de *Z. mobilis* aos mesmos antimicrobianos utilizados neste trabalho e concluiu que 70% das linhagens apresentaram resistência a ampicilina, 90% foram resistentes a amicacina e 100% das cepas foram resistentes à ofloxacina, demonstrando uma possível resistência intrínseca de *Z. mobilis* a este último antimicrobiano.

Estes resultados divergem dos apresentados por Zhou et al. (2005) que demonstraram que todas as cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram sensíveis aos antibióticos β -lactâmicos, dentre os quais a ampicilina.

O equilíbrio e a composição da microbiota intestinal são importantes para o bem-estar e para a nossa proteção frente à invasão de agentes patógenos. Para manter o equilíbrio e a normobiose intestinal, microorganismos probióticos devem ser consumidos (D'AIMMO et al., 2007).

Devido a ampla distribuição de bactérias probióticas em alimentos, estas bactérias podem funcionar como vetores para a disseminação de determinante resistência antimicrobiana (OUOBA et al., 2008).

A propagação de resistência ocorre através de diferentes mecanismos de mutação, como aquisição de plasmídios de resistência e transposons. Após esta etapa, o gene é amplificado e pode ser transmitido para outro microrganismo e chegar ao hospedeiro, contribuindo para a disseminação da resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica.

Por isso, a susceptibilidade de bactérias probióticas aos antibióticos é um importante critério para verificar a segurança e possível compatibilidade com a antibioticoterapia. Sendo também importante realizar uma caracterização fisiológica e tecnológica desses microrganismos (AMMOR et al., 2007; COLLADO; SANZ, 2007; KÖLL et al., 2008).

TABELA 6: Suscetibilidade de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 a dez antimicrobianos

Antimicrobianos	Valores dos Halos de Inibição (mm) ($\bar{X} \pm DP$)	Classificação (CLSI, 2003)
Eritromicina	$17,0 \pm 3,46$	Sensível
Cefoxitina	$18,0 \pm 0,00$	Sensível
Azitromicina	$22,0 \pm 3,00$	Sensível
Ofloxacina	$0,0 \pm 0,0$	Resistente
Sulfazotrim	$31,3 \pm 2,08$	Sensível
Imipenem	$38,3 \pm 1,52$	Sensível
Cloranfenicol	$14,6 \pm 3,51$	Sensível
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	$35,6 \pm 1,15$	Sensível
Amicacina	$12,3 \pm 2,51$	Resistente
Ampicilina	$10,3 \pm 1,52$	Resistente

X: Média aritmética

DP: Desvio-padrão

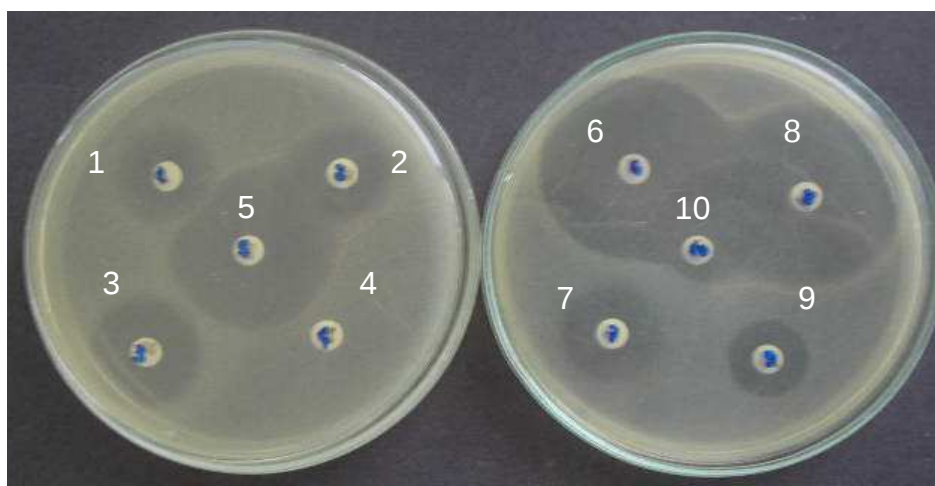


FIGURA 9: Atividade antimicrobiana dos seguintes antimicrobianos: 1-Eritromicina; 2- Cefoxitina; 3- Azitromicina; 4- Ofloxacina; 5- Sulfazotrim; 6- Imipenem; 7- Cloranfenicol; 8- Amoxicilina/Ácido Clavulânico; 9- Amicacina; 10- Ampicilina sobre *Z. mobilis* UFPEDA 355.

5.5 Influência da concentração do inóculo de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 sobre a atividade antagônica *in vitro* e sobre o pH da cultura de *Z. mobilis* em co-cultura com *Escherichia coli* O157:H7 ou com *Escherichia coli* ATCC 8739

O efeito antagônico da cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 355 sobre culturas de *E. coli* foi observado e estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$), quando a cultura de *Z. mobilis* foi padronizada em 10^9 UFC/mL. Este efeito foi visualizado a partir das três primeiras horas, aumentando progressivamente e sendo máxima em doze horas de contato para o sorotipo entero-hemorrágico de *E. coli*, cuja redução das células viáveis desta cultura foi da ordem de $1,60 \pm 0,06$ UFC/mL.

Para *E. coli* ATCC 8739, a atividade máxima ocorreu após nove horas de contato, com uma redução das células viáveis da ordem de $1,67 \pm 0,07 \log_{10}$ UFC/mL (FIGURAS 10 e 11).

Não foram observadas diferenças significativas entre as atividades antagonistas da cultura de *Z. mobilis* UFPEDA 355 quando utilizadas nas concentrações de 10^8 UFC/mL e 10^7 UFC/mL sobre *E. coli* O157:H7 ($p < 0,05$).

Para *E. coli* ATCC 8739 houve inibição significativa do crescimento quando foi utilizada *Z. mobilis* na concentração de 10^8 UFC/mL ($p < 0,05$).

Estes resultados corroboram às diversas publicações que relatam uma melhor atividade probiótica em concentrações acima de 10^9 UFC/mL para sua ação terapêutica, sendo esta a dose diária recomendada (GOMES; MALCATA, 1999; HEWIG et al., 2006; SAAD, 2006; WAARD et al., 2001).

Em trabalho realizado anteriormente por Rocha (2003), foi observada a atividade do liófilo de *Z. mobilis* frente várias cepas de *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase. Todas as cepas mostraram-se sensíveis ao liófilo e a atividade aumentou com o tempo de contato. Estes resultados corroboram aos aqui apresentados sobre *E. coli* O157:H7.

Não houve redução significativa de pH entre *Z. mobilis* e suas co-culturas nos diferentes inóculos utilizados ($p < 0,05$) (FIGURAS 10 e 11).

Os valores de pH obtidos ao longo de 24 horas mostraram-se dependentes da concentração celular nas diferentes culturas de *Z. mobilis*, existindo uma redução significativa do mesmo quando foi comparadas culturas de *Z. mobilis*, entre si, na concentração de 10^7 UFC/mL e 10^8 UFC/mL ($p < 0,05$). Essa redução foi maior quando foi comparada as culturas de *Z. mobilis* nas concentrações de 10^7 UFC/mL e 10^9 UFC/mL ($p < 0,01$).

O efeito inibitório de bactérias lácticas sobre o crescimento de microrganismos patogênicos é atribuído não só a produção de ácidos, mas também a produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (BRASHEARS; DURRE; 1999).

Gonçalves de Lima (1968) estudou o efeito do peróxido de hidrogênio na inibição microbiana e verificou que *Z. mobilis* não é capaz de produzir este composto, não sendo ele, o responsável pela atividade antimicrobiana.

Embora nenhum estudo tenha sido realizado tentando relacionar a presença de bacteriocinas à atividade antagônica ao longo do crescimento de *Z. mobilis*, Lima (2002) detectou a presença de uma substância com caráter microbicida na cultura de *Z. mobilis* incubada por 24 horas, mas até o momento a mesma não foi caracterizada quimicamente.

Falcão de Moraes et al. (1993) numa revisão sobre *Z. mobilis*, encontrou valores relativamente altos de acetaldeído, álcool isoamílico e n-propanol detectados por cromatografia gasosa no destilado de *Z. mobilis* das cepas UFPEDA 198 e UFPEDA 199, embora a atividade antimicrobiana destes compostos nunca fora testada. Estas substâncias associadas a possíveis bacteriocinas produzidas por *Z. mobilis* podem estar relacionadas com a inibição do crescimento de *E. coli* relatada neste trabalho.

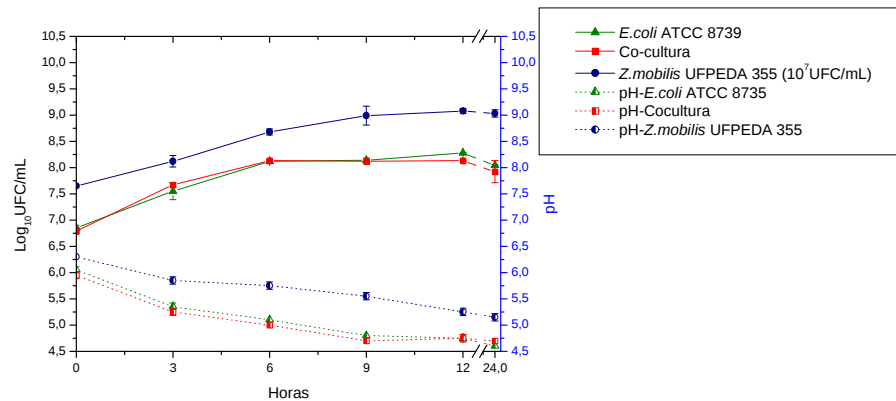
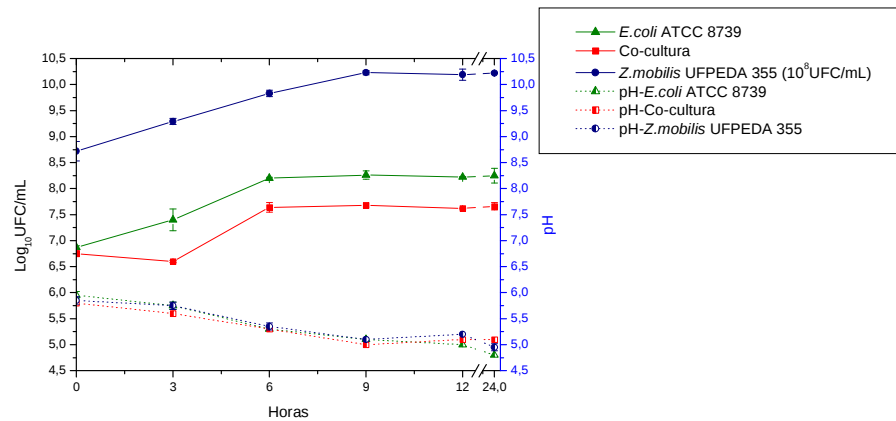
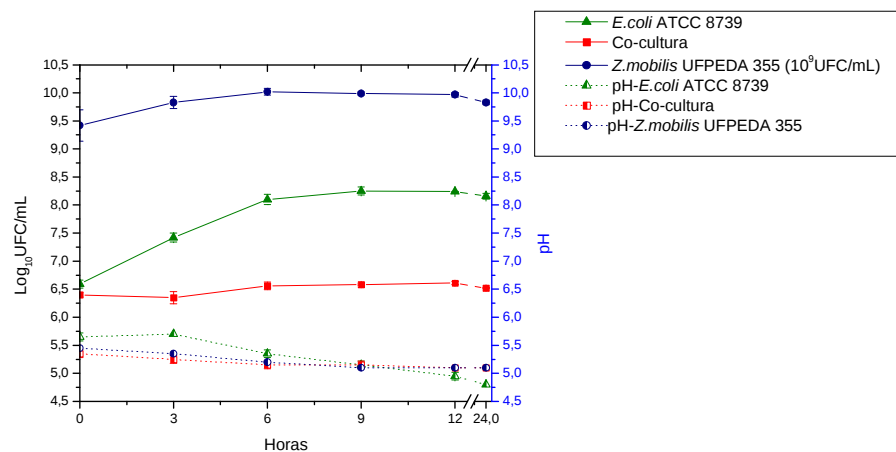
A**B****C**

FIGURA 10: Atividade antagônica de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 (10⁶ UFC/mL). **A:** *Z. mobilis* (10⁷ UFC/mL); **B:** *Z. mobilis* (10⁸ UFC/mL); **C:** *Z. mobilis* (10⁹ UFC/mL). Valores de pH das culturas de *Z. mobilis*, de sua co-cultura com *E. coli* ATCC 8739 ao longo de 24 horas.

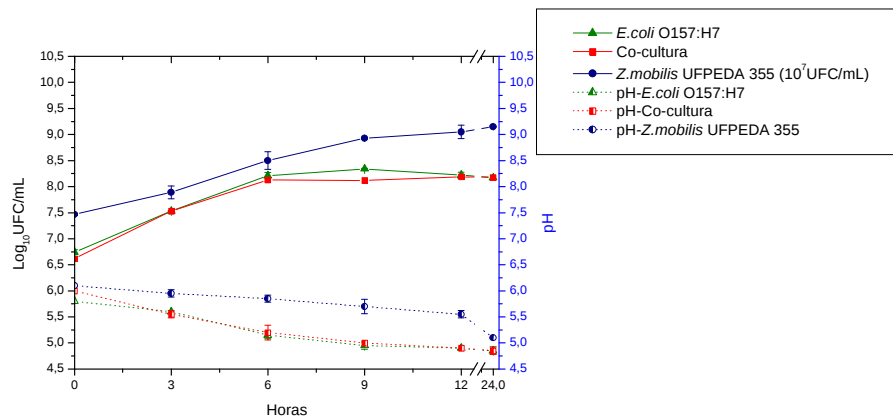
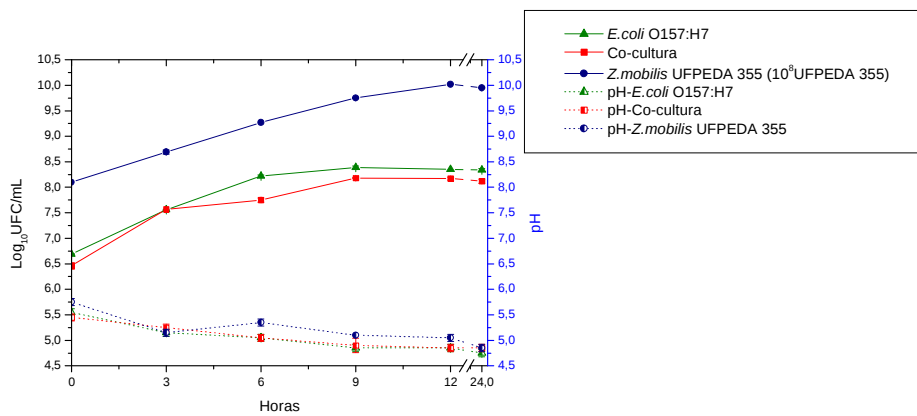
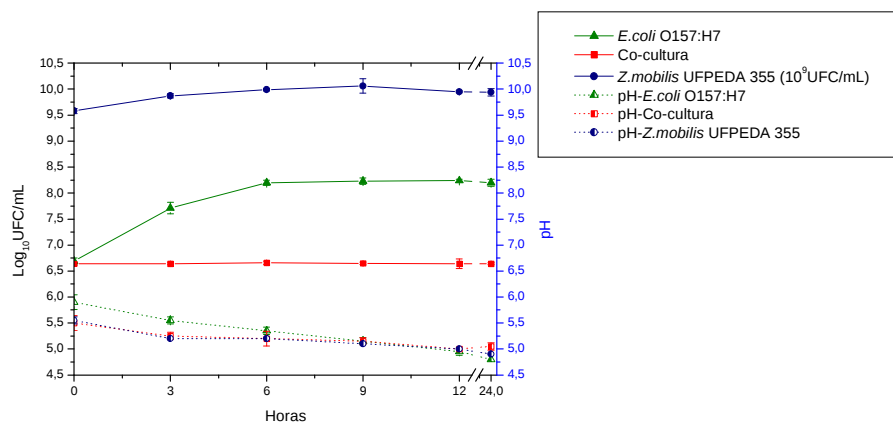
D**E****F**

FIGURA 11: Atividade antagônica de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 frente a *Escherichia coli* O157:H7 (10^6 UFC/mL). **D:** *Z. mobilis* (10^7 UFC/mL); **E:** *Z. mobilis* (10^8 UFC/mL); **F:** *Z. mobilis* (10^9 UFC/mL). Valores de pH das culturas de *Z. mobilis*, de sua co-cultura com *E. coli* O157:H7 ao longo de 24 horas.

5.6 Determinação de uma possível translocação de *Z. mobilis* UFPEDA 355 da mucosa intestinal para a corrente sanguínea

Não houve crescimento de células de *Z. mobilis* nos meios de ágar sangue nem no ágar MacConkey, correspondentes às amostras de sangue coletadas de todos os animais tratados, como mostra a figura 12, o que permite sugerir que esta cepa é considerada não patogênica, corroborando aos resultados encontrados por Azêredo (2004) em estudos realizados com *Z. mobilis* UFPEDA 202.

Antes de serem incorporados a produtos alimentícios, os microrganismos probióticos devem ser cuidadosamente avaliados para verificar a segurança e a eficácia dos mesmos. Devido a preocupação com a dieta/saúde, as indústrias de laticínios estão desenvolvendo novos produtos funcionais. Conseqüentemente, é importante que o consumidor obtenha informações precisas sobre os benefícios destes microrganismos à saúde (BRANDÃO, 2002; SALMINEN et al., 1998).

Resultados publicados acerca da translocação de bactérias possivelmente probióticas reacionam a características intrínsecas à cepa estudada. Alguns autores como Lara-Villoslada et al. (2007) avaliaram a toxicidade oral de *Lactobacillus coryniformis* e *Lactobacillus gasseri* e concluíram que não houve translocação bacteriana para a corrente sanguínea nem para o baço ou fígado. Em contrapartida, os estudos de Cannon et al. (2005), demonstraram que algumas espécies de *Lactobacillus* são freqüentemente associadas a bacteremias, endocardites e infecções localizadas em indivíduos imunocomprometidos. *L. casei* e *L. rhamnosus* são as espécies mais isoladas em casos de septicemia e endocardite. Nas endocardites, 47% dos casos estão relacionados a problemas odontológicos e além das duas espécies citadas há também relatos da presença de *L. plantarum*.

Segundo alguns autores, a capacidade que microrganismos probióticos têm de sobreviverem às condições gástricas e de se aderirem fortemente à mucosa intestinal após a administração oral, pode acarretar no risco de translocação bacteriana, bacteremia, sepse e aumentar a virulência bacteriana em indivíduos imunodeprimidos (BOYLE et al., 2006; ISOLAURI et al., 2004; LAND et al., 2005).

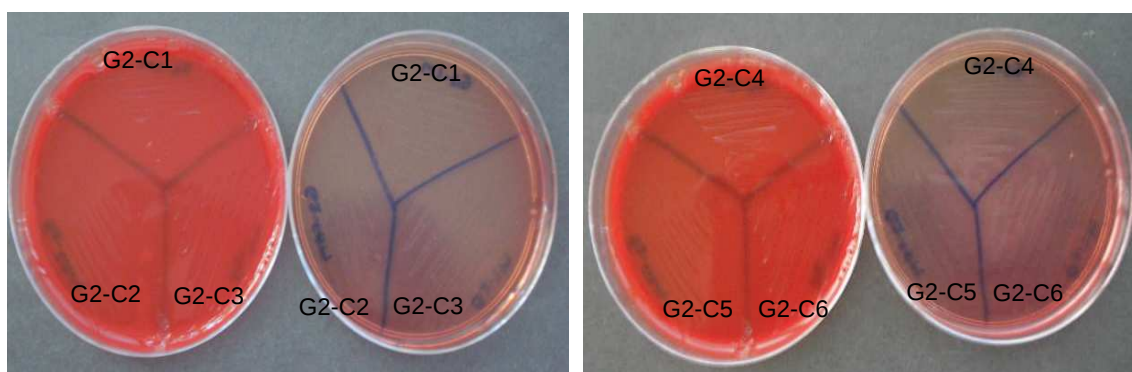


FIGURA 12: Cultura de sangue de seis camundongos tratados com *Zymomonas mobilis*. Ausência de crescimento bacteriano no meio ágar sangue e no ágar MacConkey. **G2:** Grupo tratado com *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355; **C:** camundongo.

5.7 Determinação das possíveis alterações dos órgãos vitais (fígado, baço, rim e intestino) de camundongos após ingestão da cultura de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355

No estudo histológico do baço, fígado, rim e intestino delgado dos camundongos não foi evidenciado qualquer alteração morfológica nos grupos experimentais, como mostra a figura 13.

No baço (FIGURA 13A), foi observado distribuição uniforme dos folículos linfóides primários e secundários e das bainhas peri-arteriolares da polpa branca. No intestino delgado (FIGURA 13B), foi observada uniformidade na morfologia das vilosidades. As placas de Peyer apresentaram-se preservadas, com sua estrutura morfológica normal. Nos rins (FIGURA 13C), não foram observados presença de infiltrado inflamatório, esclerose ou edema glomerular No fígado (FIGURA 13D), não houve sinais de necrose ou infiltrado inflamatório, estando os hepatócitos bem preservados..

O epitélio intestinal desempenha um papel de fronteira e barreira imunológica, estabelecendo a interface entre o conteúdo luminal e as células imunológicas subepiteliais. Qualquer perturbação nesta barreira, desencadeada por antígenos dietéticos, microrganismos patógenos, agentes químicos ou radiações, conduz a um

aumento da permeabilidade intestinal e a alterações estruturais no epitélio, as quais podem ocasionar aumento do fluxo destes antígenos e provocar diversos tipos de inflamação (GOMES; MALCATA, 1999).

Segundo alguns estudos, os lactobacilos intestinais promovem o aumento da proteção mediada pela barreira intestinal, por aumentar a secreção de muco, impedindo a ligação dos patógenos aos sítios de ligação nas células conferindo uma maior resistência do hospedeiro à infecção (REID; BURTON, 2002; SPANHAAK et al. 1998).

Estes resultados também estão de acordo com os encontrados por Azerêdo (2004) que estudou os efeitos da ingestão de *Z. mobilis* em ratos e também concluiu que não houve translocação bacteriana para o sangue nem alterações morfológicas em órgãos vitais (fígado, baço e intestinos).

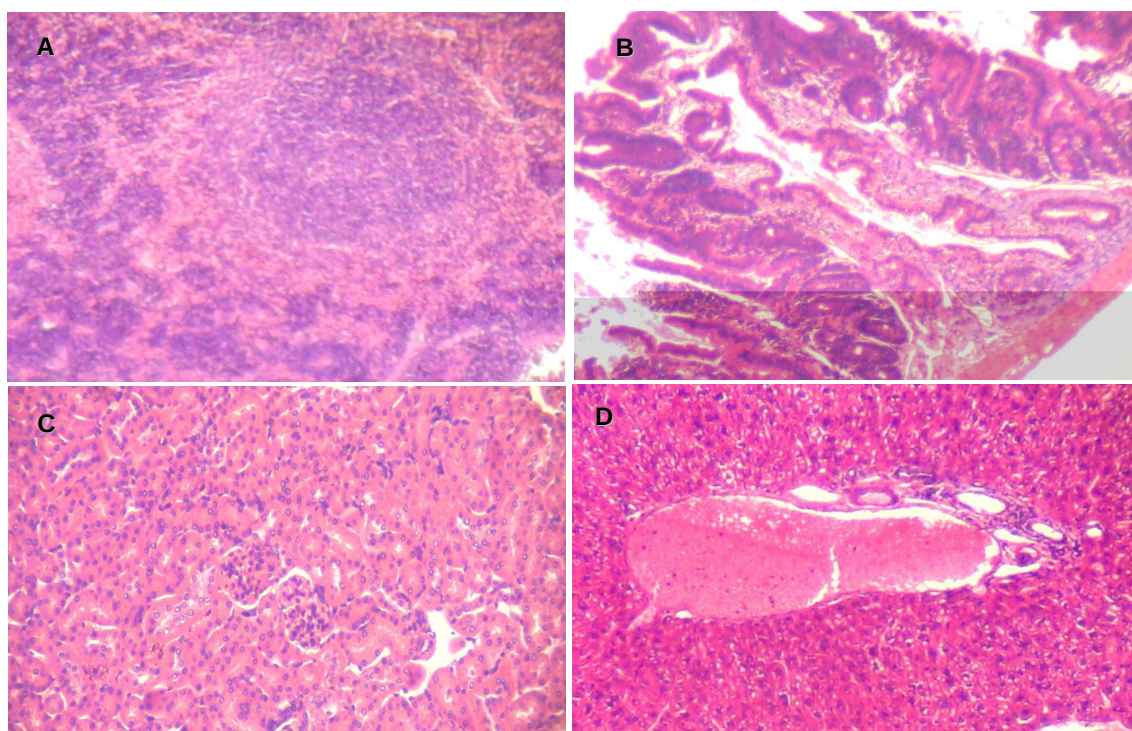


FIGURA 13: Cortes histológicos do baço (200x) (A), intestino (100x) (B), rim (C) (200x) e fígado (100x) (D) de camundongo tratado com *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355, mostrando o aspecto morfológico normal, dos respectivos órgãos.

6 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- Dos microrganismos-teste utilizados para avaliação qualitativa do antagonismo, as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram as que apresentaram maior sensibilidade à ação dos metabólitos de *Z. mobilis*;
- Nenhum antagonismo de *Z. mobilis* foi observado sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*;
- *Z. mobilis* UFPEDA 355 mostrou-se sensível ao meio SSDL em pH 2,0, entretanto foi tolerante ao meio SSDL nos pH 2,5; 3,0; 4,0;
- Quanto à tolerância à bile, foi observado crescimento de *Z. mobilis* UFPEDA 355 em todas as concentrações de bile ensaiadas;
- *Z. mobilis* UFPEDA apresentou um perfil de sensibilidade para eritromicina, cefoxitina, azitromicina, sulfazotrim, imipenem, cloranfenicol, amoxicilina/ácido clavulânico, mas foi resistente a ofloxacina, ampicilina e amoxicilina;
- Na avaliação quantitativa da atividade antagônica de *Z. mobilis* UFPEDA 355 frente às culturas de *E. coli* ATCC 8739 e *E. coli* O157:H7 foi observado uma relação entre a atividade antagônica com a concentração do inóculo e que apenas a concentração de 10^9 UFC/mL foi efetiva. Também foi constatado que não houve influência do pH no antagonismo da cultura de *Z. mobilis* sobre suas co-culturas nos diferentes inóculos utilizados;

- No estudo *in vivo* foi comprovado que não houve translocação de *Z. mobilis* UFPEDA 355 para corrente sanguínea, como também não foram observadas alterações histológicas nos órgãos vitais dos camundongos atestando que *Z. mobilis* UFPEDA 355 é uma bactéria não patogênica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiol.**, v. 24, p. 559-570, 2007.

AMROUCHE, T. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries: analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. **Net**, 2005. Doctorat en sciences et technologie des aliments – Université Laval–Québec. Disponível em <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/5f73a576-ffd4-4557-aa82dd3ad-2002199/22772.html>. Acesso em 15 de Maio de 2007.

AZERÊDO, G. A. **Efeitos da ingestão de *Zymomonas mobilis* em ratos Wistar**. 2004. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco – Recife.

BACELAR, T. S. **A ação da *Zymomonas mobilis* na peritonite experimental: Influência no desenvolvimento de peritonite, mortalidade e formação de abscesso**. 1997. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BAUER, A.N.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. et al. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEGLEY, M.; CORMAC, G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.

BOYLE, R. J.; ROBBINS-BROWNE, R. M.; TANG, M. L. K. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, p. 1256-64, 2006.

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Ind. Lat.**, p. 64-66, 2002.

BRASHEARS, M. M.; DURRE, W. A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. **J. Food Prot.**, v. 62, n. 11, p. 1336-1340, 1999.

BRINGER, S.; HARTNER, T.; PORALLA, K.; SAHM, H. Influence of ethanol on the hopanoid content and fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. **Arch. Microbiol.**, v. 40, p. 312-316, 1985.

BRINK, M.; SENEKAL, M.; DICKS, L. M. T. Market and product assessment of probiotic/prebiotic-containing functional foods and supplements manufactured in South Africa. **South Afr. Med. J.** v. 95, n. 2, p. 114-119, 2005.

BROEKAERT, I. J.; WALKER, A. Probiotics and chronic disease. **J. Clin. Gastroenterol**, v. 40, n. 3, p. 270-274, 2006.

BROWN, A. C.; VALIERE, A. Probiotics and medical nutrition therapy. **Nutr. Clin. Care.**, v.7, n. 2, p. 56-68, 2004.

CALAZANS, G.M T.; LOPES, C. E.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F. P. Molecular weight and antitumour activities of *Zymomonas mobilis* levans. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.27, p.245-247, 2000.

CALDERÓN, O. et al. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 57, n. 1, p. 51-56, 2007.

CANNON, J. P.; LEE, T. A.; BOLANOS, J. T.; DANZIGER, L. H. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, p. 31-40, 2005.

CAPURSO, G.; MARIGNANI, M.; FAVE, G. D. Probiotics and the incidence of colorectal câncer: when evidence is not evident. **Dig. Liver Dis**, v. 38, p. S277-S282, 2006.

CAVALCANTI, K. P. S. **Caracterização de treze cepas de *Zymomonas mobilis* tolerantes ao ácido clorídrico e à bile bovina.** 2004. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco – Recife.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 759-768, 1998.

CHIODA T. P et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Cienc. Rur.**, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

CHOU, L.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 23-31, 1999.

CHUNG, H. S.; KIM, Y. B.; CHUN, S. L.; JI, G. E.. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 47, n. 1-2, p. 25-32, 1999.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. **Approved standard M2-A8:** performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 8th ed. n. 20, 2003.

COLADO, M. C.; SANZ, Y. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. **J. Microbiol. Methods.**, v. 66, n. 3, p. 560-563, 2006.

COLLINS, J. K.; THORTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selectiona of probiotics strains for human applications. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 487-490, 1998.

CONNOR, B. A. Travelers' Diarrhea. **Center for disease control and prevention**, cap. 4, 2005.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta immune. **Ciênc. Rur.**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

DABÉS, A.C.; SANTOS, W.L.M.; PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 53, p. 136-140, 2001.

D'AIMMO, M. R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium spp.* isolated from dairy and pharmaceutical products. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 115, n. 1, p. 35-42, 2007.

DE LUIS, D. A. et al. Estudio de la influencia del consumo de lácteos fermentados em una población de pacientes alérgicos. **An. Med. Inter.**, v. 22, n. 2, p. 55-58, 2005.

DE ROOS, N. M.; KATAN, M. B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **Am. J. Clin.Nutr.**, v. 71, p. 405-11, 2000.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. 26.ed. São Paulo: Produção: **J. Bras. Med.**, 2000/2001. Écosystème gastro-intestinal: composition et évolution. **Net**, 2005. Disponível em: <<http://www.theses.ulaval.ca/2005/22772/ch02.html>>. Acesso em 15 de Maio de 2007.

DUNNE. C.; MURPHY, L.; MORRISSEY, D.. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p.386-392, 2001.

FALCÃO DE MORAIS, J O. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. **Rev. Inst. Antib.**, n.1 e 2, p.169-182, 1982/3.

FALCÃO DE MORAIS, J. O., RIOS, E. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **J. Biotechnol.**, v. 31, n. 2, p. 75-91, 1993.

FAYOL-MESSAOUDI, D. et al. pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 10, p. 6008-6013, 2005.

FERNANDES, Tiago Gomes; AZEVEDO-XIMENES, E. . Determinação da sensibilidade de *Zymomonas mobilis* a diversos agentes antimicrobianos. **In: XIV CONIC - Congresso de iniciação científica UFPE**, 2006, Recife. XIV CONIC - Congresso de iniciação científica UFPE. Recife, 2006.

FERREIRA, A. P.; ASTOLFI-FERREIRA, C. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. **VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura**, p. 56-69, 2006.

Food and Agriculture Organization and World Health Organization-FAO/WHO. Expert Consultation. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization; 2001. Available from: ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf (Acesso em 12 de Fevereiro de 2007).

FOX, S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Vet. Med.**, v.83, n.8, p.806-829, 1988.

FREITAS, A. G. **Atividade Antimicrobiana da Cultura de *Zymomonas mobilis* frente a Isolados Clínicos de *Staphylococcus aureus***. Monografia Curso em Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Pernambuco-2001.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J.Appl.Bact.** 66, p: 365-378,1988.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Intest. Microecol. Consult.**, v. 59, p. 439-442, 1990.

FULLER, R., GIBSON, G.R. Modification of the intestinal microflora using probióticos and prebiotics. Scandinavian **J. Gastroenterol.**, v.32, suppl. 222, p.28-31, 1997

GOLOWCZYK, N. A. et al. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 118, p. 264-273, 2007.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Boletim de Biotecnologia. **Soc. Portuguesa Biotecnol.**, n. 64, 1999.

GÓMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F.; INGLIS, V. A review on the use of microorganisms as probiotics. **Rev. Latinam. Microbiol.**, v. 40, p. 166-172, 1998.

GONÇALVES DE LIMA, O. Sobre uma interessante e pouco conhecida publicação de Paul Lindner acerca do emprego terapêutico de *Zymomonas mobilis* Kluyver e Van Niel, 1936 (*Pseudomonas lindneri*) **Rev. Inst. Antib.** v.1, n.2, p. 119-124, 1968

GONÇALVES DE LIMA. O., ARAÚJO, J.M., SHUMACHER, CAVALCANTI DA SILVA, E. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo de Recife. I - Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (LINDNER) KLUYVER E VAN NIEL (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* (Gonçalves de Lima, Araújo, Schumacher & Cavalcanti) (1970), isolada da bebida popular denominada “caldo-de-cana picado”. **Rev. Inst. Antib.** v.10, n.1/2, p.3-16, 1970.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The lancet**, v. 60, p. 512-519, 2003.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 237-238, 1998.

GUGLIELMOTTI, D.; MARCÓ, M. B.; VINDEROLA, C.; GAVILÁN, C. R.; REINHEIMER, J.; QUIBERONI, A. Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-resistant mutants with acquired bile tolerance. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 119, n. 3, p. 236-242, 2007.

HELWIG et al. Lactobacilli, bifidobacteria and *E. coli* nissle pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. **W. J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 37, p. 5978-5986, 2006.

HERMANS, M. A. F.; NEUSS, B.; SAHM, H. Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 5592-5595, 1991.

HOLT, J. O.; KRIEG, N. R.; SNEATH, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 201, 1994.

HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, T.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p. 1324-1332, 2006.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JACOBSEN, C. N., NIELSEN, V. R., HAYFORD, A. E., MOLLER, P. L., MICHAELSEN, K. F., PAERREGAARD, A., SANDSTRÖM, B., TVEDE, M. and JAKOBSEN, M. Screening of probiotics activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. By in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4949-4956, 1999.

JALES, S. T. L. **Avaliação da atividade microbiológica e tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas cápsulas e flaconetes à base de *Zymomonas mobilis*.**

1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

JAUHIAINEN, T et al. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. **Am. J. Hypert.**, v. 18, p. 1600-1605, 2005.

JIN, L. Z.; IHO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry. **Sci. J.**, v. 53, p.351-368, 1997.

JIN, L. Z.; IHO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 183-185, 1998.

KALNENIEKS, U. Physiology of *Zymomonas mobilis*: some unanswered questions. **Adv. Microbial Physiol.**, v. 51, p. 73-117, 2006.

KIM G. B.; LEE, B. H. Genetic analysis of a bile salt hydrolase in *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis KL612. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, p. 778-790, 2008.

KÖLL, P.; MÄNDAR, R.; MARCOTTE, H.; LEIBUR, E.; MIKELSAAR, M.; HAMMARSTRÖM, L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, n. 3, p. 139-147, 2008.

LAND, M. H.; ROUSTER-STEVENSON, K; WOODS, C. R.; CANNON, J. C.; CNOTA, J.; SHETTY, A. K. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. **Pediatrics**, v.115, p. 178-81, 2005.

LARA-VILLOSLADA, F. et al. Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714. **J. Appl. Microbiol.** v. 103, p. 175-184, 2007.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. Handbrook of probiotics. New York: wiley, p. 211, 1999.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends Fd. Sci. Technol.** v. 6, p. 241-245, 1995.

LIMA, G. M. S. **Ocorrência de Bacteriocinas e Caracterização Molecular de Linhagens de *Zymomonas mobilis***. 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife.

LOPES, C. A. C.; GONÇALVES DE LIMA, O.; SILVA-FILHO, A. A.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; SILVA, E. C.; MELO, B. R. Efeitos obtidos com o emprego de culturas de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em pacientes portadores de enterocolites bacterianas. **Rev. Inst. Antib.**, v.20, n. ½, p. 69-78, 1980.

MADSEN, K. Probiotics and the immune response. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 40, n. 3, p. 232-234, 2006.

MAGALHÃES NETO, B., GONÇALVES DE LIMA O., MARINHO DE ALMEIDA, A., OTAMAR DE MORAIS, J. A utilização de carboidratos e outras substâncias nutritivas por *Zymomonas mobilis* (= *Pseudomonas lindneri*), cepa Ag II isolada em 1951. **Anais da Escola Superior de Química**. v.1, n 1, p.83-88, 1958.

MARTEAU, P. R.; VRESE, M.; CELLIER, C. J.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Am. J. Clin.Nutr**, v. 73, p. 430S-6S, 2001.

MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L.; RAMOS, M. S.; MARTINS, M. C.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, N. J. Resistência de Bactérias Lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente microrganismos indicadores. **Rev. Ciênc. Agrov.** v. 5, n. 1, p. 53-59, 2006.

MATSUMOTO, T et al. Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 672-680, 2008.

MONTELONE, G. et al. Bacteria and mucosal immunity. **Digest. Liver Dis.**, v. 38, p. S256-S260, 2006.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 4 ed. São Paulo: Michalany, 2004.

MOREAU, R. A.; POWELL, M. J.; FETT, W. F.; WHITAKER, B. D The effect of ethanol and oxygen on the growth of *Zymomonas mobilis* and the levels of hopanoids and other membrane lipids. **Curr. Microbiol.**, v. 35, p. 124-128, 1997.

NEUMANN, E. et al. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazil. J. Med. Biol. Research**, v. 31, n. 12, p. 1565-1573, 1998.

OLIVARES, M .et al. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. **Int. Microbiol.**, v. 9, p. 47-52, 2006.

OLIVEIRA - SEQUEIRA, T. C. G. et al. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Cienc. Rural**, Santa Maria 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008005000001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 21 de Junho de 2008.

OUOBA, L. I. I.; LEI, V; JENSEN, L. B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 121, n. 2, p. 217-224, 2008.

PAULA GOMES, A. Observações sobre a utilização de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver & Van Niel, 1936. (*Termobacterium mobile*, Lindner, 1928; *Pseudomonas lindneri*, Kluyver & Hoppenbrouwers, 1931), na terapêutica humana. **Rev. Inst. Antib.** v.2, n.1/2, p.77-81, 1959.

PEREIRA, D. I.; McCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 8, p. 4743-4752, 2003.

PORCHART, P.; MARTEAU, P.; GODEREL, B. Y.; BORLIOUX, P. I.; RAMBAUD, J. C. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, p. 78-80, 1992.

RAUTAVA, S.; KALLIOMÄKI, M.; ISOLAURI, E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, p. 119-121, 2002.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 3763-6, 1999.

REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 437S-43S, 2001.

REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 319-324, 2002.

REID, G.; BRUCE, A. W. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 1, p. S77-80, 2001.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 1682S-7S, 2000.

ROCHA, C. S. **Obtenção do liófilo de *Zymomonas mobilis* (Lindner) DAUFEPE 199 e determinação de sua atividade bactericida frente diferentes cepas de *Escherichia coli***. 2003. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, p. 396S-402S, 2000.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazil. J. Pharmacol. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SALMINEN et al. Demonstration of safety of probiotics - a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 44, p. 93-106, 1998.

SANDERS, M. E. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 384S-390S, 2000.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 319-331, 2001.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANTOS, J. F. M.; VASCONCELOS, J. F. N.; MONTENEGRO, S. M. L.; AZEVEDO-XIMENES, E..The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.**, v. 7, n. 6, p. 502-504, 2004.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1901-1906, 1989.

SCHMIDT, A.; BRINGER-MEYER, S.; PORALLA, K.; SAHM, H. Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 32-36, 1986.

SOUZA, C. SOUZA, L. A. G. Colpitis and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev. Inst. Antib.**, v. 13, n.10, p. 35-87, 1973.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Eur. J. Clin.Nutr.**, v. 52, p. 899-907, 1998.

STANTON, C. et al. Market potential for probiotics. **Am. J. Clin.Nutr.**, v. 73, p. 476-483, 2001.

STEFFEN, E.K. & BERG, R.D. Relationship between caecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. **Infect. Immun.** v. 39, p. 1215–1259, 1983.

SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L.; PACIFICO, S.; COPPOLA, R. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, n. 1, p. 129-137, 2005.

SWINGS, S. & DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriol. Rev.**, v. 41, n.1, p. 1-46, 1977.

TEIXEIRA, J. S. **Atividade antagônica da cultura de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 202 frente a diversos sorotipos de *Salmonella***. 2005. (Monografia) – Universidade Federal de Pernambuco – Recife.

VALDÉZ, J. C. et al. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. **Clin Microbiol Infect.**, v. 11, n. 6, p. 472-479, 2005.

VASCONCELOS, J.C.S.N. **Avaliação da atividade antifúngica e padronização do liófilo da cultura de *Zymomonas mobilis***. 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) -Universidade Federal de Pernambuco- Recife.

VERNAZZA, C. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Carbohydrate preferente, acid tolerante and bile tolerante in five Strains of *Bifidobacterium*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, n. 4, p. 846-853, 2006.

VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **Am. J. Clin.Nutr.**, v. 73, p. 421S-9S, 2001.

WAARD et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strains Shirota against gastrointestinal *Listeria monocytogenes* infection in rats. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 73, p. 93-100, 2001.

WANICK, M. C.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, E. C.; SCHUMACHER, I. E. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* (Lindner,1928) Kluyver e van Niel (1936). **Rev. Inst. Antib.**, v. 10, n. 1/2, p. 47-50, 1970.

WANICK, M. C.; SILVA, E. C. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*. **Rev. Inst. Antib.**, v. 11, p. 69-71, 1971.

WHITE, D. C.; SUTTON, S. D.; RINGELBERG, D. B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7, p. 301-306, 1996.

WILLIAMS & WILKINS, L. Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 43, p. 550-557, 2006.

YATES, J. Information from your family doctor. Traveler's diarrhea: what you should know. **Am. Fam. Physician**, v. 71, n. 11, p. 2107-8, 2005.

ZHOU, J. S. et al. Safety assement of potencial probiotic lactic acid bacterial Straits *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* HN017 and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **Int. Food Microbiol.**, v. 56, p. 87-96, 2000.

ZHOU, J. S. et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 98, n. 2, p. 211-217, 2005.

8 ANEXOS

8.1 Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 15 de maio de 2008

Ofício nº 30/08

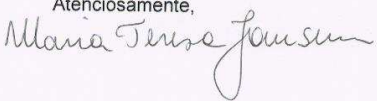
Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Eulália de Azevedo Ximenes**
Departamento de Antibióticos - CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.005814 / 2008-18

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado ***"Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA355 como microrganismo probiótico"***.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


CCB: Integrar para desenvolver

8.2 Meios de cultura

- Meio líquido SSDL (Standard Swings e De Ley) utilizado na manutenção e ativação das culturas de *Zymomonas mobilis* (Swings; De Ley, 1977);
- Meio sólido e semi-sólido de SSDL (Standard Swings e De Ley) utilizado para obtenção de cultivos e enumeração das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Zymomonas mobilis*;
- Meio sólido de Mueller-Hinton e Sabouraud, empregado para avaliação da pureza da cultura de *Zymomonas mobilis* durante o processo fermentativo;
- Meios líquidos e semi-sólidos de Mueller-Hinton e Sabouraud para realização da padronização dos inóculos e do antagonismo microbiano.
- Brain Heart Infusion (BHI) para as hemoculturas, Ágar MacConkey e Ágar Sangue para os semeios das mesmas.

8.3 Processamento histológico

- Desidratação em sucessivos alcoóis de proporções crescentes: 70%, 80%, 90% e 100% por 40 minutos cada, em temperatura ambiente;
- Diafanização e clarificação pelo xilol: álcool-xilol, xilol 1 e xilol 2 por 40 minutos cada, em temperatura ambiente;
- Impregnação em parafina 1 e parafina 2, por 30 minutos cada, na estufa a 60°C;
- Inclusão em blocos de parafina;
- Execução da microtomia e pescagem dos cortes histológicos em duas lâminas por grupo;
- Secagem e colagem dos cortes na estufa por 20 minutos a 60°C;
- Desparafinização das preparações histológicas pelo xilol 1 e xilol 2 por dez minutos;
- Hidratação em sucessivos banhos de proporções decrescentes de alcoóis: 100%, 90%, 80%, 70% e água potável;

- Segregação e coloração das lâminas pela Hematoxilina e Eosina (HE), pelo método do Tricômico de Masson (MICHELANY, 2004);
- Desidratação, clarificação e montagem das preparações com resina e lamínula.

Em seguida, as leituras das lâminas foram realizadas, em microscópio óptico, com aumento de 40 e 100 vezes. O objetivo foi observar as possíveis alterações morfológicas das células e tecidos.

8.4 Indicadores de produção 2006-2008

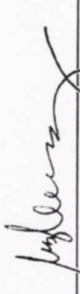
8.4.1 Trabalhos apresentados em Congressos



CERTIFICADO

Certificamos que **Atividade Antagônica da Cultura de *Zymomonas Mobilis* Ufpeda 355 Sobre *Escherichia Coli* O157:H7** participou na qualidade de Pôster, sendo apresentado por **Amanda Rafaela Carneiro De Mesquita**, tendo como co-autores **Tiago Gomes Fernandes**; **Eulalia Azevedo Ximenes** no **"24º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA"**, no período de 03 a 06 de Outubro de 2007, em Brasília/DF.

Brasília, 06 de Outubro de 2007.


Marina Baquerizo Martínez
Presidente SBM


Matiza Landgraf
Vice - Presidente SBM

SBM
Sociedade Brasileira de Microbiologia

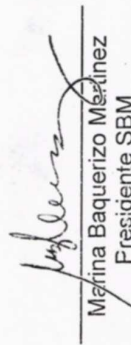


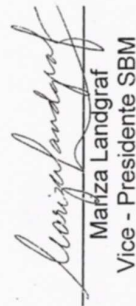
EVENTOS SIMULTÂNEOS
II Encontro Latino-Americano de Microbactérias
XII Simpósio Brasileiro de Microbactérias
II Simpósio de Coleções de Cultura
IV Encontro de Ensino em Microbiologia

CERTIFICADO

Certificamos que **Determinação da Resistência de Zymomonas Mobilis a Diversos Agentes Antimicrobianos** participou na qualidade de Pôster, sendo apresentado por **Tiago Gomes Fernandes**, tendo como co-autores **Amanda Rafaela Carneiro De Mesquita**; **Eulalia Azevedo Ximenes** no **24º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, no período de 03 a 06 de Outubro de 2007, em Brasília/DF.

Brasília, 06 de Outubro de 2007.


Marina Baquerizo Martínez
Presidente SBM


Mariza Landgraf
Vice - Presidente SBM

SBM
SOCIETAS
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA



EVENTOS SIMULTÂNEOS
II Encontro Latino-Americano de Microbactérias
XII Simpósio Brasileiro de Microbactérias
II Simpósio de Coleções de Cultura
IV Encontro de Ensino em Microbiologia

C e r t i f i c a d o

Certificate of Participation

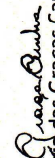
5th to 7th of May, 2008



WORKSHOP INTERNACIONAL EM
Biotechnologia
III Encontro III Jornada
67th Minutem
Certificados de LIKA

We hereby certify that the poster entitled "Avaliação da atividade antagonista de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 sobre *Escherichia coli* O157:H7" authored by Mesquita, A. R. C., Fernandes, T.G.; Azevedo-Ximenes, E, has been presented in the "1st International Workshop on Biotechnology, 3rd Alfa-Valnatura Meeting, 3rd Scientific Journey of LIKA", held in Recife, Pernambuco, Brazil.


Prof. Dr. Solange Galvão Coutinho
Pro-Rector for Extra-Mural Studies


Prof. Dr. Maria das Graças Carneiro da Cunha
President of Organising Committee

PROEXT
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária | Recife/PE



C e r t i f i c a d o

Certificate of Participation

5th to 7th of May, 2008



I WORKSHOP INTERNACIONAL EM
Biotechnologia
III Encontro III Jornada
Alfa-Valnatura
Caracterização de *ZMA*

We hereby certify that the poster entitled "Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como potencial probiótico" authored by Mesquita, A. R. C., Fernandes, T.G.; Azevedo-Ximenes, E., has been presented in the "1st International Workshop on Biotechnology, 3rd Alfa-Valnatura Meeting, 3rd Scientific Journey of LIKA", held in Recife, Pernambuco, Brazil.


Prof. Dr. Solange Galvão Coutinho
Pro-Rector for Extra-Mural Studies


Prof. Dr. Maria das Graças Carneiro da Cunha
President of Organising Committee

PROEX II
PRO-REITORIA DE EXTENSÃO

Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária + Recife/PE



Mesquita, Amanda Rafaela Carneiro de

Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como microorganismo probiótico / Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita. – Recife: O Autor, 2008.

xv, 76 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Zymomonas mobilis*. 2. Probióticos. I.Título.

579.84
616.014

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2008-116