

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência de capa, folha de rosto, ficha catalográfica, sumário e resumo, não incluídos pelo autor no arquivo original.

Ando devagar porque já tive pressa, levo
esse sorriso porque já chorei demais...

(Almir Sater e Renato Teixeira)

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com a expansão da indústria avícola, a salmonelose tornou-se fator limitante na criação de aves, adquirindo importância relevante na saúde pública, e como perdas econômicas, pois estão presentes em todas as fases, ou seja, da produção ao consumo dos produtos de origem aviária.

A ausência de métodos mais eficazes no controle das salmoneloses aviárias, e o uso indiscriminado de antibióticos por quase toda vida do animal, levou a comunidade científica internacional buscar métodos alternativos, que poderia vir a substituir os antibióticos na produção de frangos de corte sem causar danos a microbiota intestinal normal e sem deixar resíduos na carcaça dos animais.

O uso de probiótico na dieta das aves contribui para saúde e crescimento, uma vez que cria um ecossistema intestinal estável e ainda dificulta a colonização do intestino por bactérias patogênicas. A seleção de bactérias para uso como probióticos é realizada pela avaliação de seus produtos de metabolismo, bem como pelo seu potencial de colonização em locais específicos.

Com o crescente número de probióticos que atualmente vêm sendo produzidos, faz-se necessário o controle de qualidade e a verificação da

eficácia destes produtos. Diversas bactérias como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* são utilizadas como probióticos, em associados ou não.

Algumas espécies de *Lactobacillus* spp. podem transformar a lactose em ácido láctico (homofermentativas), enquanto outras, além de ácido láctico também originam etanol, acetato e dióxido de carbono (heterofermentativas). O aumento do ácido láctico diminui o pH intestinal, dificultando a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Podem também produzir peróxido de hidrogênio, responsável pela inibição do crescimento de certas bactérias anaeróbias, além de bacteriocinas, cuja ação antimicrobiana pode inativar ou matar outras espécies bacterianas. Devido a essas vantagens, como também à sua tradicional utilização na produção de alimentos fermentados, as bactérias ácido lácticas vem sendo intensamente estudadas, pois as pesquisas sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular desses microrganismo tiveram um avanço significativo, permitindo a detecção da produção de substâncias promotoras de antibioteses como as bacteriocinas.

As bacteriocinas das bactérias ácido lácticas são em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas, apresentando de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, e que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e as suas propriedades bioquímicas.

A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* é a bacteriocina melhor caracterizada atualmente. É a única bacteriocina

aprovada internacionalmente e legalizada para utilização em alimentos. Sendo considerada não tóxica para seres humanos, pois é rapidamente inativada pela α -quimiotripsina, enzima produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado. A sensibilidade das bacteriocinas de *Lactococcus lactis* à degradação por enzimas proteolíticas é bastante interessante com respeito à segurança alimentar, uma vez que a ingestão de bacteriocinas não promove alterações na ecologia do trato digestivo. Não apresentando, dessa forma, os mesmos riscos relacionados ao uso de antibióticos. Contudo, estudos toxicológicos são necessários para os novos tipos de bacteriocinas, para sua aprovação como conservadores de alimentos.

Muitas outras bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas estão sendo ainda caracterizadas. O *Lactobacillus reuteri* que habita naturalmente o trato gastrointestinal de humanos e animais, tem sido amplamente estudado durante anos. Eles demonstram uma capacidade de sintetizar e secretar substâncias antimicrobianas denominadas de reuterin, com ação antagônica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, fungos, protozoários e vírus.

O *Lactobacillus salivarius* produz uma bacteriocina denominada de salivaricina B, a qual apresenta um amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Brochotrix thermosphacta*, *Enterococcus faecalis* e muitos *Lactobacillus*.

Diante da importância tecnológica do gênero *Lactobacillus* e da escassez de pesquisas a respeito de substâncias antimicrobianas produzidas

por suas espécies, seria de interesse e importância para o desenvolvimento de probióticos para uso avícola, a seleção de cepas devidamente identificadas, produtoras de bacteriocinas e que apresentem atividade antimicrobiana contra microrganismos indesejáveis (patogênicos), assim como a caracterização dessas bacteriocinas, garantindo a segurança do produto e conseqüentemente a sua qualidade.

... Hoje me sinto mais forte, mais feliz
quem sabe. Só levo a certeza de que muito pouco
eu sei, eu nada sei...

(Almir Sater e Renato Texeira)

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar a capacidade inibitória das espécies de *Lactobacillus* spp. frente a microrganismos indicadores, através da prova de atividade antimicrobiana pelo método de antagonismo “spot on the lawn” e pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Isolar do ingúvio e cecos de aves, bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus*.

2.2.2 Avaliar o efeito inibitório *In vitro* das cepas de *Lactobacillus* spp. frente aos microrganismos indicadores Gram-positivos e Gram-negativos pelo método de antagonismo “spot on the lawn”.

2.2.3 Extrair bacteriocinas dos *Lactobacillus* spp. que apresentaram efeito inibitório pelo método de antagonismo “spot on the lawn”, e analisar a ação antagônica frente aos microrganismos indicadores Gram-positivos e Gram-negativos através do método de antagonismo simultâneo de difusão em poços.

... É preciso amor para poder pulsar. É preciso
paz para poder sorrir. É preciso a
chuva para florir...

(Almir Sater e Renato Texeira)

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

A constante evolução técnica pela qual passa a avicultura industrial tem possibilitado a obtenção de produtos avícolas de baixo custo, saudáveis e altamente nutritivos (ANDREATTI FILHO & SAMPAIO, 1999). O seu desenvolvimento ocorreu logo após a segunda guerra mundial, representando uma nova fonte alternativa de proteína animal de fácil e rápida produção em pequenas áreas. Neste mesmo período o mundo viu surgir a penicilina como primeiro antibiótico (MACHADO, 2000).

Estudos recentes relatam que os antibióticos comerciais usados como promotores de crescimento, podem alterar a efetividade dos cultivos da exclusão competitiva (HUMBERT et al., 1991), adquirindo efeito adverso sobre a eficácia da proteção em pintos recém-nascidos (NURMI & RANTALA, 1974). Segundo Machado (2000), o uso indiscriminado destes produtos na dieta das aves, constituídos por quimioterápicos em doses subterapêuticas por quase toda vida do animal, apresentam algumas contra indicações devido ao desenvolvimento de populações bacterianas resistentes.

Produtos probióticos e prebióticos, embora não apresentem todas as ações benéficas dos antibióticos, não determinam resíduos nos produtos de

origem animal e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos, por serem produtos essencialmente naturais, o que já lhes coloca em simpática posição em todos os segmentos da cadeia de produção e consumo de proteína animal (SILVA & ANDREATTI FILHO, 2000). Dentro deste contexto, começou a ser formado um novo conceito de aditivo na comunidade científica internacional, que poderia vir a substituir os antibióticos na produção de frangos de corte sem causar danos a microbiota intestinal normal e sem deixar resíduos na carcaça dos animais (FULLER, 1989).

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro, podendo ser modulada pela composição da dieta (TANNOCK, 1998). Em animais saudáveis, esta composição microbiana permanece constante, mas quando se quebra a estabilidade através de fatores internos (HAVENAAR et al., 1992) ou fatores externos como alteração de alimentos e água (TANNOCK & SAVAGE, 1974), administração de antibióticos e radiação podem desestabilizar a microbiota e os microrganismos patogênicos são capazes de colonizar o intestino, levando a sérias infecções (HAVENAAR et al., 1992).

Em condições normais, as aves jovens recebem a microbiota principalmente das mães, e em galinhas e perus, a transferência de microrganismos é muito eficiente quando os recém-nascidos são criados próximos aos adultos. Devido aos sistemas modernos de produção em

massa atualmente desenvolvidos pela indústria avícola, impossibilita-se este contato, com o conseqüente retardo no desenvolvimento da microbiota intestinal protetora (TORTUERO, 1973). A formação desta se dá imediatamente após o nascimento e aumenta durante as primeiras semanas de vida. Nas aves com microbiota estabelecida, *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum* e *L. reuteri* predominam no ingluvío e intestino delgado, enquanto *L. acidophyllus* é encontrado no ingluvío, cloaca, duodeno, jejuno e cecos, apresentando funções benéficas contra bactérias patogênicas (MACHADO, 2000).

Estudos de Andreatti Filho et al. (2000), mostram que microrganismos da microbiota cecal anaeróbia das aves, determinam proteção contra a colonização por patógenos, diminuindo a quantidade de *Salmonella* Typhimurium e *S. Enteritidis* nas fezes.

Com a grande expansão da indústria avícola, a salmonelose tornou-se fator limitante na criação de aves, adquirindo importância relevante pois as perdas econômicas estão presentes em todas as fases, ou seja, da produção ao consumo dos produtos de origem aviária. Salmonelose é o termo que designa um grande grupo de doenças aviárias agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997). As aves contaminadas tornam-se portadoras intestinais, eliminando o microrganismo via fezes por longo período de tempo. Os frangos assim contaminados, introduzem a bactéria no abatedouro. As implicações epidemiológicas e econômicas das intoxicações alimentares em humanos podem alcançar

grande magnitude. A crescente incidência se deve à ingestão de produtos de origem aviária contaminados e/ou indevidamente preparados, visto que as aves são reservatórios de *Salmonella* sp (GAST, 1997; TOOD, 1997).

O efeito protetor da microbiota intestinal contra a colonização por patógenos é conhecido há muitos anos e tem sido amplamente aceito (PARRA, 1994). A habilidade de proteção conhecida como exclusão competitiva (EC), foi primeiramente descrita pelo professor Esko Nurmi na Finlândia, em 1973, relatando que dosagem oral da microbiota nativa de aves adultas livre de *Salmonella* poderiam proteger as aves contra microrganismos patogênicos (NURMI & RANTALA, 1973). Day (1992), define o termo EC como a inabilidade de uma população de microrganismos em estabelecer-se no intestino, em razão da presença de outra população bacteriana. Em outras palavras, ou uma população de microrganismos apresenta maior sucesso ao estabelecer-se em um determinado ambiente, ou ela é produtora de algum metabólito que seja tóxico para outra população microbiana.

Os produtos de EC são originados do cultivo integral da microbiota intestinal, enquanto probióticos provêm de um ou mais componentes previamente identificados. Atualmente utiliza-se o termo probiótico para designar suplemento alimentar composto de organismos vivos, que quando consumidos beneficiam a saúde do hospedeiro (FULLER, 1989). Havenaar et al. (1992) definiram os probióticos como culturas puras ou compostas de microrganismos vivos que, fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam o hospedeiro estimulando a ação das propriedades existentes na microbiota

natural. Lilly & Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, observando a ação de microrganismos como promotores de crescimento. A seleção de bactérias probióticas é realizada pela avaliação de seus metabólitos, potencial de colonização e capacidade de multiplicação em locais específicos (FRETER et al., 1983).

Aproximadamente 90% da microbiota intestinal das aves é composta por bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, etc) e bactérias anaeróbias estritas (*Fusobacterium*, *Eubacterium*, etc). Os 10% restantes consistem de *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* (FOX, 1988). Estes microrganismos devem encontrar as condições propícias para colonização e persistência, como temperatura e pH adequados e oferta de nutrientes (MILLES, 1993). A ação dos probióticos no organismo se refere principalmente à inibição que estes exercem na colonização do intestino por bactérias patogênicas. Os mecanismos através dos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas seriam a produção de substâncias antimicrobianas, competição por nutrientes, alteração do metabolismo microbiano, estimulação do sistema imunológico a partir da capacidade de adesão à mucosa intestinal (TRAVI, 2002).

Segundo Cocconcelli (1993), as bactérias da microbiota intestinal e/ou probióticos, podem produzir uma variedade de substâncias antimicrobianas. São muitas as bactérias e leveduras que podem ser usados de forma benéfica para manter uma microbiota digestiva saudável e equilibrada. Com o

crescente número de probióticos que atualmente vem sendo produzidos, fazem-se necessários o controle de qualidade e a verificação da eficácia destes produtos. A constatação à campo, através da obtenção de melhores índices zoeconômicos é facilmente verificada, desde que sejam adaptados parâmetros técnico-científicos adequados para aferição destes resultados (PIVNICK et al., 1985).

Os *Lactobacillus* são os mais conhecidos na indústria avícola. Trata-se de bactérias ácido lácticas que podem transformar o produto final da fermentação da lactose em ácido láctico (homofermentativas), e/ou etanol, acetato e dióxido de carbono (heterofermentativas). Com o aumento do ácido láctico é possível ocorrer a diminuição do pH intestinal, impossibilitando a sobrevivência de microrganismos patogênicos. São também produtores de peróxido de hidrogênio o qual inibe o crescimento de certas bactérias anaeróbias e as bacteriocinas com ação antibacteriana, podendo inativar ou matar outras espécies bacterianas (MICHAEL et al., 1997).

3.1 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Nos primeiros anos do século XX, o cientista Elie Metchnikoff ressaltava a importância da ingestão continuada de *Lactobacillus* para a promoção da saúde, e nesta mesma época ele identificou o *Lactobacillus bulgaricus*, desenvolvendo um fermento, que passou a ser largamente adicionado a produtos lácteos nos anos que se seguiram (METCHNIKOFF,

1907).

As bactérias ácido lácticas são encontradas em alimentos como leite, carne e vegetais, compondo também a microbiota normal da cavidade oral, intestino e vagina de mamíferos. Os principais representantes das bactérias ácido lácticas são os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* e *Streptococcus*, formando um grupo de bactérias com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns (LIMA et al., 1975). Estas e outras bactérias encontram-se em todos os níveis do trato gastrointestinal das aves, mas em diferentes quantidades em função das diferentes localizações (HILL, 1990; BAQUERO, 1992; BOURLIOUX, 1994).

A denominação das bactérias ácido lácticas, vem do fato que a energia na forma de ATP é obtida através da fermentação de carboidratos, produzindo ácido láctico como principal produto final, mas elas são incapazes de sintetizar ATP por meio respiratório, devido a sua incapacidade de sintetizar citocromos e enzimas contendo o grupo heme (hemoproteínas) (LIMA et al., 1975).

No entanto, não existe uma definição unânime do termo “bactéria láctica”. Assim a definição descrita para o grupo no Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (HOLT et al., 1984, 1989), seria Gram-positiva, não esporulada, catalase negativa, desprovidas de citocromos, crescimento em condições de aerobiose, microaerofilia ou anaerobiose facultativa, com temperatura variando entre 35°C a 40°C (dependendo da espécie). Cepas de

Lactobacillus acidophyllus demonstraram crescimento a temperatura mínima de 19°C e 22°C e máxima entre 47°C e 51°C (COLLINS & HARTLEIN, 1982). Nutricionalmente, são bastantes fastidiosas, requerendo carboidratos, aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, compostos orgânicos de carbono como fonte de energia e sais minerais. São bactérias ácido tolerante, com metabolismo estritamente fermentativo, sendo que o ácido láctico é o principal produto da fermentação de carboidratos (WIJTZES et al., 1997; AXELSSON, 1993). Sua classificação é baseada na morfologia, forma de fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, habilidade de crescimento em altas concentrações salinas, diferenças no metabolismo envolvendo a produção de ácido láctico e tolerância a ácidos e bases (KANDLER & WEISS, 1986; AXELSSON, 1993).

Embora em taxonomia bacteriana a utilização da morfologia como característica chave seja questionável, a análise morfológica é muito importante para a identificação bacteriana. Sendo assim, estas podem ser divididas em bacilos (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros) (SCHILLINGER & LUCKE, 1987; AXELSSON, 1993). Uma característica importante utilizada para diferenciação dos gêneros das bactérias ácido lácticas é a forma de fermentar a glicose sob condições padronizadas, podendo ser divididas em homofermentativas (resulta quase exclusivamente em ácido láctico) e heterofermentativas (produção de ácido láctico, etanol, acetato e dióxido de carbono) (AXELSSON, 1993). Na prática, com o teste de produção de gás a partir de glicose e também produção de amônia permite dividir o gênero *Lactobacillus*, em três grupos

heterofermentativos (AXELSSON, 1998).

Para identificação dos *Lactobacillus* spp. isolados de carne e outros produtos, Schillinger & Lucke (1987), propuseram um esquema baseado nas diferenças do perfil de fermentação de alguns carboidratos, permitindo assim, uma rápida classificação das espécies. Porém, na maioria dos casos, essa identificação deve ser confirmada pela determinação de características adicionais como por exemplo, um maior número de carboidratos através do sistema API 50 CH (COX & THONSEM, 1990), eletroforese de proteínas celulares (SAMELIS et al., 1995), técnicas de hibridização de DNA (GASSER, 1970; SHARPE, 1981; DYRES et al., 1994; BERNET-CAMARD et al., 1997) e determinação da composição dos ácidos graxos celulares (GILAROVA et al., 1994).

Gusils et al. (1999), observaram *In vivo* adesão de *Lactobacillus animalis* e *L. fermentum* nas células intestinais, concluindo que *L. fermentum* reduziu a colonização de *Salmonella Pullorum*, enquanto *L. animalis* inibiu a adesão de *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*. O gênero *Lactobacillus* faz parte da família *Lactobacteriaceae* e da tribo *Lactobacillae* (ORLA-JENSEN, 1921). Apresentam colônias pequenas, apigmentadas, arredondadas, com bordos bem delimitados e aspecto cremoso. Produzem lactato e acetato, reduzindo o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano, excreção de metabólitos que inibem bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas, produção de vitaminas do grupo B, ativação do sistema imune contra células malignas e restauração da microbiota após

antibioticoterapia (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

Nos últimos anos, além da utilização de bactérias ácido lácticas como probióticos, estuda-se também sua aplicação como conservantes em alimentos. Muitas espécies utilizadas na produção de alimentos fermentados, tem apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo bactérias do mesmo gênero e/ou patogênicas. A eficácia e espectro de ação contra microrganismos patogênicos ocorrem devido a uma gama de metabolitos produzidos por estas bactérias, denominados de substâncias antimicrobianas, as quais incluem os ácidos orgânicos como ácido láctico e ácido acético (GILLILAND & SPECK, 1972), peróxido de hidrogênio que inibe o crescimento de patógenos através de forte efeito oxidante nas células bacterianas (PRICE & LEE, 1970; GILLILAND & SPECK, 1972), ou através da destruição molecular da estrutura básica dos ácidos nucleicos e proteínas celulares (DAHL et al., 1989), e pela produção de proteínas específicas ou complexo de proteínas denominadas bacteriocinas.

De acordo com Tannock (1995) e Sanders (1998) as culturas probióticas propiciam benefícios a saúde através da inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis (patogênicos) por exclusão competitiva e ação das substâncias antagônicas. Além de apresentarem características imunomodulatória, imunoestimulatória, atividades antimutagênicas, também incrementam e auxiliam a digestão da lactose, metabolizam o colesterol diminuindo o nível de absorção, reduzindo o risco de problemas cardiovasculares (pressão sangüínea), mantém a integridade das mucosas e

diminui a incidência e/ou duração de diarreias (KLAENHAMMER, 1998).

Salminen et al. (1996), descreveram que a adesão das cepas probióticas na superfície intestinal e a subsequente colonização do trato gastrointestinal de humanos tem demonstrado um importante pré-requisito de ação benéfica. A aderência das cepas bacterianas ocorre provavelmente por persistirem longamente no trato intestinal e deste modo tem melhor possibilidade de mostrar os efeitos metabólitos e imunomodulatórios, do que as cepas que não conseguem adesão. A capacidade de adesão em interação com a superfície da mucosa intestinal, facilita o contato com o mesentério associado com o tecido linfóide, mediando assim o local e estimulando o sistema imune. Deste modo, a aderência de bactérias probióticas tem demonstrado indução dos efeitos imunes e também a propriedade de desestabilizar a barreira da mucosa intestinal. A adesão pode significar exclusão competitiva de bactérias patogênicas no epitélio intestinal (BERNET et al., 1993; COCONNIER et al., 1993).

O interesse pela identificação das bactérias ácido lácticas e os estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, levando à detecção de outros compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose, como as bacteriocinas (DAVIDSON & HOOVER, 1993), as quais são conhecidas como peptídeos com ação bactericida ou bacteriostática, demonstrando atividade antagônica contra microrganismos patogênicos (BRUNO & MONTIVILLE, 1993).

3.2 BACTERIOCINAS

Grande parte das bactérias produzem substâncias que inibem ou matam espécies intimamente relacionadas ou mesmo diferentes linhagens de uma mesma espécie. Estas substâncias são chamadas de bacteriocinas e se distinguem dos antibióticos que possuem um largo espectro de atividade, por serem peptídeos e terem seus genes estruturais freqüentemente presentes em plasmídios e transposons (COLICINAS, 2003).

Sob a designação de bacteriocinas, estão muitas substâncias produzidas por bactérias que inibem outros microrganismos. A diferença principal entre bacteriocinas e antibióticos é que as primeiras não são utilizadas para tratar doenças clínicas infecciosas (MONTVILLE & KAISER, 1993).

As bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas que apresentam atividades antimicrobianas, contra espécies intimamente relacionadas com o organismo produtor (BRUNO & MONTVILLE, 1993; EIJSINK et al., 1996). O primeiro registro sobre as bacteriocinas foi em 1925 quando André Gratia demonstrou que uma substância inibidora produzida por *Escherichia coli*, denominada cepa Gratia's V, apresentava atividade bactericida contra outras cepas de *E. Coli*, hoje conhecida por colicina. (LEWUS, 1991). As colicinas constituem um diversificado grupo de proteínas antimicrobianas, as quais inibem o crescimento bacteriano através de inibição da síntese celular, permeabilizando a membrana celular, ou inibindo a atividade da RNASE ou DNASE (CLEVELAND et al., 2001). Os trabalhos com

colicinas foram importantes, pois permitiram o desenvolvimento dos métodos básicos atualmente utilizados para detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas (LEWUS, 1991).

Na definição original Tagg et al. (1976), determinou que o termo bacteriocinas referia-se a proteínas que apresentavam características como: estreito espectro de atividade inibitória, presença essencial de uma fração protéica biologicamente ativa, modo de ação bactericida, ligação a receptores específicos, informação genética plasmidial determinante da produção e imunidade das células alvo da bacteriocina e produção por biossíntese letal.

Devido as discrepâncias entre colicinas e as bacteriocinas das bactérias Gram-positivas, Tagg (1991), propôs a utilização do termo “substância inibidora semelhante a bacteriocina” (em inglês, “bacteriocin-like inhibitory substance” ou BLIS), para descrever as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.

Dentre as bactérias Gram-positivas, as bactérias ácido lácticas têm sido amplamente exploradas, mostrando ser um grande produtor de proteínas antimicrobianas, apresentando um potencial efeito “natural” na preservação dos alimentos (CLEVELAND, 2001).

Outras vantagens é que as bacteriocinas são proteínas não tóxicas, de fácil digestão, resistentes ao calor e à acidez, não apresentam riscos de resíduos alimentares e são usadas para aumentar a segurança e vida útil de muitos alimentos (LETHBRIDGE, 2002).

As bacteriocinas de bactérias ácido lácticas são em geral, pequenas proteínas catiônicas, apresentando de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado e que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, espectro de ação, peso molecular e propriedades bioquímicas (KAISER & MONTVILLE, 1996).

A nisina é a bacteriocina melhor caracterizada atualmente. Descoberta nos anos 20, é classificada como um lantibiótico de 34 aminoácidos, inibindo a multiplicação unicamente de bactérias Gram-positivas. Produzida pelos *Lactococcus lactis* subs *lactis* desempenham um papel significativo no processo de fermentação, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação dos alimentos (MORENO, 1995). Esta, foi caracterizada como potente conservante biológico, sendo responsável pela inibição do crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes (KAISER & MONTVILLE, 1996). A nisina é única bacteriocina produzida comercialmente e legalizada para utilização na produção de queijos fundidos, requeijão, queijo pasteurizado, enlatados, leite e derivados (STEVENS et al., 1991; GARCERÁ et al., 1993). Segundo Fowler (1979), para sua efetiva utilização, devem-se estimar a quantidade de contaminação e a concentração necessária para a inibição, seguindo-se normas estabelecidas na legislação vigente (12,5 mg/kg).

3.2.1 Nomenclatura das Bacteriocinas:

A nomenclatura é baseada na adição do sufixo “cina” ao gênero ou ao nome da espécie, para denotar atividade bacteriocinogênica, sendo porém,

inconsistente e subjetiva (MONTVILLE & KAISER, 1993; TAGG et al., 1976).

Montville & Winkowski (1997), relataram que a nomenclatura para as bacteriocinas é contraditória e ainda está em discussão. A dificuldade existe porque uma espécie bacteriana pode produzir mais de uma bacteriocina, algumas são denominadas com base no nome das espécies (plantaricina, sakacina, caseicina) ou dos gêneros dos microrganismos produtores (lactococcina, lactocina, pediocina), outras são designadas genericamente como lactostrepcina, nisina e diplococcina para bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Lactococcus*. Letras seqüenciais assinaladas em ordem de descoberta são utilizadas após o nome da bacteriocina para diferenciação das produzidas por diferentes cepas de uma mesma espécie, como a lactacina F que se refere a sexta bacteriocina reportada para uma espécie de *Lactobacillus* (MONTVILLE & KAISER, 1993; KLANHAMMER, 1988; KOZAK et al., 1978; TAGG et al., 1976).

Para uma especificação mais precisa, têm sido sugerido que além da designação usual, seja acrescentado o nome da linhagem produtora (TAGG et al., 1976). Ainda segundo Tagg et al. (1976), o procedimento mais adequado seria denominar as substâncias antimicrobianas que ainda não foram completamente caracterizadas como “substâncias inibidoras semelhantes às bacteriocinas” e de bacteriocinas àquelas que apresentarem uma natureza protéica e um modo de ação bactericida, enquanto McCornick & Savage (1983) sugerem o mesmo termo à todas as substâncias inibidoras de natureza protéica.

A confusão gerada por muitos nomes diferentes para mesma molécula prejudica o desenvolvimento das pesquisas (MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997), assim um nome de bacteriocina seria dado somente após a identificação da seqüência de aminoácidos, provando de fato que a bacteriocina é única (JACK et al., 1995).

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes, de acordo com propriedades estruturais e físico-químicas:

- As bacteriocinas da classe I e II são as mais conhecidas, apresentando peso molecular inferior a 10Kda e termoestabilidade (Nisinas A e Z, lactocinas A, B e M).

Classe I – São denominados lantibióticos, pois contém em sua estrutura química aminoácidos raramente encontrados na natureza, tais como: lantionina, β -metil lantionina e resíduos desidratados. Ex: nisina, lactacina 481, camocina U149, lactocina S.

Classe II – É o maior grupo de bacteriocinas e pode ser dividido em três subclasses:

II a – Peptídeos anti-*Listeria* com seqüência de aminoácidos YGNGV (tirosina, glicina, asparagina, glicina e valina) próximo à porção N-terminal. Ex: lactococcina A e pediocinas.

II b – Peptídeos formadores de poros na membrana celular. Para sua atividade é necessária a presença de dois peptídeos diferentes. Ex:

lactococcina G e F.

III c – Peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos. Ex: lactococcina B e carnobacteriocina A.

· As classes III e IV não são bem conhecidas, apresentando peso molecular superior a 30Kda, termolábeis, podendo ser proteínas hidrofílicas ou complexos de proteínas, fosfolipídios e/ou açúcares (Helveticina J, lactacina A e B, plantaricina S, pediocina SJ 1, entre outras).

Classe III – São proteínas termolábeis, apresentando peso molecular superior a 30 Kda. Ex: helveticina J, acidofina a, lactacinas A e B.

Classe IV – São proteínas complexas, compostas por uma fração protéica e um ou mais grupos funcionais requeridos para a sua atividade. Esses grupos podem ser fosfolipídios e/ou açúcares. Ex: plantaricina s, leuconocina S, lactocina 27.

3.2.2 Mecanismo de Ação das Bacteriocinas

De acordo com Garcerá et al. (1993), o mecanismo de ação da maior parte das bacteriocinas não foi elucidado ainda. Entretanto, estudos sobre o mecanismo de alguns lantibióticos e pequenos peptídios, revelam que a ação das bacteriocinas ocorre na membrana citoplasmática. A idéia de que as bacteriocinas agem na membrana celular é bem aceita, mas o exato mecanismo não está claro (MONTVILLE et al., 1995). Estudos de Bruno et al.

(1992) e Bruno & Montville (1993), mostraram que o mecanismo de ação comum das bacteriocinas provenientes de bactérias lácticas é o colapso da força próton-motriz, sendo esta, vital na síntese de ATP e em processos de membrana que requerem energia, como o acúmulo de íons e metabólitos, assim, a dissipação desta força causa a morte celular. Gonzales et al. (1996), mostraram que a plantaricina C, uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* LL 441, apresentou como alvo primário a membrana plasmática de células sensíveis, determinando a presença de poros, permitindo assim a livre passagem de solutos do interior da célula para o ambiente.

Stevens et al. (1991) e Schved et al. (1994) evidenciaram que a camada lipopolissacarídica da membrana externa de bactérias gram-negativas contém grupos aniônicos (íons de magnésio), importantes para sua estabilidade e resistência, dificultando a ação das bacteriocinas.

Stevens et al. (1991), demonstraram que o uso de agentes quelantes como ácido etileno diamino tetra-ácetico, sal dissódico (EDTA), assim como aquecimento e/ou refrigeração e a associação de nisina e EDTA desestabilizam a integridade da membrana externa dos microrganismos resistentes, favorecendo assim a ação da nisina frente a *Salmonella* e *Escherichia coli*.

A ação das bacteriocinas dá-se em duas fases. A primeira fase é a adsorção da bacteriocina a receptores específicos e inespecíficos da membrana celular da bactéria alvo. Nesta fase, a bacteriocina é sensível a enzimas proteolíticas. A segunda fase é irreversível e envolve mudanças

letais em cepas sensíveis à bacteriocina (DESMAZEAUD, 1997).

A nisina, como outras bacteriocinas, possui atividade antimicrobiana contra um número limitado de bactérias, não inibindo bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos (DELVES-BROUGHTON, 1990). Algumas espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* e também *Listeria monocytogens* são inibidas pela nisina (WILKINSON & JONES, 1977).

Estudos de Hurst (1983), esclareceram que a ação das bacteriocinas depende mais dos fatores relacionados à espécie bacteriana, como a fase e as condições de crescimento celular, do que característica relacionada a sua própria molécula. De acordo com Moreno et al. (1999), as bacteriocinas foram bastante ativas contra células em fase exponencial de crescimento, mostrando que a adsorção às células sensíveis é muito rápida, sendo influenciada pelo pH do meio da suspensão.

Várias condições ambientais incluindo pH, temperatura, aeração, concentração de açúcar, capacidade tamponante do meio e o tempo de incubação afetam a produção das bacteriocinas (LEWUS, 1991). Brink et al. (1994) observaram que a produção de acidocina B, bacteriocina produzida por *Lactobacillus acidophyllus* M46, quando cultivado em caldo MRS cinco vezes concentrado, pH 5,5, era oito vezes maior que a produzida em caldo MRS normal, sem o controle do pH.

Mortvedt-Abildgaard et al. (1995) observaram maior atividade de

bacteriocina no início da fase estacionária de crescimento da cultura em temperatura de 30°C. Quando *Lactobacillus sake* foi cultivado em pH 5, houve produção de 2.000 a 3.000 unidades arbitrárias (UA) por mL, o que representa um aumento de oito a dez vezes em relação a cultura fermentada sem controle de pH.

Segundo Tagg et al. (1976), o estado da cepa sensível também tem grande influência na susceptibilidade à ação letal das bacteriocinas, sendo que células metabolicamente ativas são mais sensíveis. Nesse sentido, verificou-se que células em fase exponencial de crescimento foram mais sensíveis a lactacina 481 (PIARD et al., 1990), a lactostreptina L5 (ZAJDEL et al., 1985), a nisina (MOHAMED et al., 1984) e a diplococcina 3466 (DAVEY, 1981).

3.2.3 Métodos para Demonstrar a Atividade das Bacteriocinas

Há diversas técnicas para detectar a produção de bacteriocinas, baseadas na inibição do crescimento de microrganismo indicador (sensível) por uma cepa teste (produtora), através da difusão das bacteriocinas em meio de cultura sólido ou semi-sólido (TAGG et al., 1976). É importante lembrar que a inibição pode ser devido a outros fatores, como a produção de ácidos orgânicos, presença de bacteriófagos, peróxido de hidrogênio ou outros inibidores não específicos. Dessa forma, experimentos adicionais são necessários para excluir a ação desses fatores (MONTVILLE & WINKOWSKI,

1997).

A presença de cepas lisogênicas produtoras de bacteriocinas, ou seja, aquelas que têm bacteriófagos integrados ao seu DNA, promovem fenômenos bastante semelhantes às bacteriocinas, dificultando a diferenciação e interferindo na avaliação dos resultados dos testes realizados (BRADLEY, 1967; TAGG et al., 1976; MAYR-HARTING et al., 1972).

As culturas produtoras podem ser inoculadas em forma de pontos (SCHILLINGER & LÜCKE, 1989) ou de estrias (BENKERROOM et al., 1993). Variações das técnicas incluem o uso de discos de papel (MOTLAGH et al., 1991), estrias perpendiculares (TAGG et al., 1976) e de inoculação em poços (TAGG & MCGIVEN, 1971).

Os métodos de antagonismo simultâneo ou direto, com ou sem inversão do ágar, podem ser utilizados para avaliação preliminar de um grande número de culturas e envolvem o crescimento da cultura indicadora simultaneamente com a cultura produtora (KEKESY & PIGUET, 1970).

Os métodos mais utilizados denominam-se “flip strack”, “spot on the lawn” e “well diffusion”. No método “flip strack” (KEKESY & PIGUET, 1970), a cepa produtora de bacteriocina é estriada em ágar, e após a incubação adequada, o microrganismo sensível é estriado perpendicularmente à cepa produtora no inverso do ágar. No método “spot on the lawn”, a cepa produtora é inoculada em ágar, incubada e em seguida o microrganismo indicador (sensível) é semeado numa camada de ágar (HARRIS et al., 1989). O método

mais direto denomina-se “well diffusion” (difusão em poços). Neste, o sobrenadante da cultura produtora de bacteriocina é adicionado a poços perfurados em ágar semeado com o microrganismo indicador (LEWUS & MONTVILLE, 1991).

A prova de atividade antimicrobiana indireta, por meio do teste de difusão em ágar, visa avaliar se a inibição foi devido a ação de substâncias semelhantes as bacteriocinas ou provocadas por outras substâncias produzidas e liberadas no meio extracelular pelas bactérias lácticas (PRADO et al., 2000).

A atividade das bacteriocinas pode ser estimada a partir do tamanho das zonas de inibição produzidas no teste de difusão em ágar (LEWUS & MONTVILLE, 1991). Devido à importância dos estudos sobre as bacteriocinas, alguns pesquisadores exploraram os métodos utilizados para detecção e incentivaram os estudos das propriedades físico-químicas, genéticas e das condições de produção (MAYR-HARTING et al., 1972).

... Penso que cumprir a vida seja
simplesmente compreender a marcha e ir tocando em
frente...

(Almir Sater e Renato Texeira)

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus de Botucatu. Tiveram início em dezembro de 2001 e término em agosto de 2003.

4.2 AVES UTILIZADAS

Utilizou-se doze aves matrizes reprodutoras das linhagens Cobb e Ross em produção, com idade variando de 25, 52 e 65 semanas, procedentes de granja comercial da região. As aves foram sacrificadas imediatamente após chegada ao laboratório, por embolia gasosa.

4.3 COLETA E CULTIVO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

Após o sacrifício das aves, os ingluvíos e cecos foram retirados assepticamente, transferidos para tubos contendo 10mL de caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS - OXOID) pH 6,5, para isolamento bacteriano. Os

tubos, em duplicata, para cada ingúvio e cecos, referentes às seis primeiras aves utilizadas, foram incubados a 37°C por 48 horas em anaerobiose (Anaerobac - PROBAC). Posteriormente, as culturas foram plaqueadas em ágar MRS (OXOID) e incubadas conforme os procedimentos anteriormente citados.

Os ingúvios e cecos das seis últimas aves, foram transferidos para tubos contendo 10mL de caldo MRS, incubados em anaerobiose sob diferentes temperaturas (25, 37 e 40°C) e períodos (12, 24 e 48 horas). Posteriormente, para cada tubo realizou-se diluições decimais em solução tampão de salina fosfatada (PBS), pH 7,0. Todas as determinações bacterianas das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foram realizadas através do plaqueamento de 0,1mL das respectivas diluições decimais em ágar MRS. Realizou-se a leitura das placas após incubação em condições de anaerobiose a 37°C por 48 horas.

Para cada placa obteve-se em média trinta colônias distintas para caracterização do gênero *Lactobacillus*. Cada colônia foi semeada em tubos contendo 2mL de caldo MRS e incubada a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Após o período de incubação, as culturas foram semeadas em placas contendo ágar MRS e incubadas a 37°C por 48 horas em anaerobiose para o crescimento das colônias.

As colônias que apresentaram formato arredondado e bordas bem delimitadas, cor branca, aspecto cremoso e com diâmetro de 2 a 3 milímetros foram submetidas aos testes de identificação do gênero *Lactobacillus*.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *Lactobacillus*.

A identificação foi baseada nas características morfológicas e fisiológicas para o gênero *Lactobacillus*, conforme Davis (1955).

4.4.1 Teste de Hidróxido de Potássio (KOH)

Colônias isoladas características do gênero *Lactobacillus*, foram misturadas continuamente com alça de níquel cromo a uma gota de solução aquosa de KOH a 3% em lâmina de vidro (POWERS,1995). Se a suspensão se tornasse viscosa e aderisse à alça, a reação era considerada KOH positiva. A positividade para o KOH ocorre porque as paredes celulares são destruídas e a suspensão torna-se viscosa devido à liberação de fragmentos de DNA. A positividade nesta reação confirma tratar-se de uma cultura Gram-negativa. Células Gram-positivas são KOH negativa, pois não formam um gel viscoso e não se aderem a alça, uma vez que a parede das bactérias Gram-positivas não é afetada pelo KOH a 3%.

4.4.2 Coloração pelo Método de Gram

As colônias características do gênero *Lactobacillus* que apresentaram reação de KOH negativa, foram coradas pelo tradicional método de Gram descrito por Pelczar,et al. (1981).

4.4.3 Produção de Catalase

O teste de produção de catalase foi realizado de acordo com Sharpe (1981). Cada colônia característica do gênero *Lactobacillus* caracterizada como Gram-positivas, foram misturadas a uma gota de solução de peróxido de hidrogênio a 3% em lâmina de vidro. A produção de bolhas indicava presença de catalase.

4.4.4 Formação de gás a partir da glicose

As colônias que apresentaram reação de KOH negativa, coloração Gram-positivas e catalase negativa foram semeadas em tubos com 10mL de caldo MRS isento de extrato de carne e acrescido de 5% de glicose, contendo tubos de Durhan. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas em aerobiose (COLLINS & HATLEIN, 1982). Posteriormente foram observados para verificar a produção ou não de gás, diferenciando as amostras de *Lactobacillus* dentro dos grupos hetero e homofermentativos (AXELSSON,1993).

4.4.5 Teste de Fermentação de Carboidratos

As amostras de *Lactobacillus* foram semeadas em 3mL de caldo MRS sem extrato de carne e glicose, adicionado de 0,002% de púrpura de bromocresol como indicador e individualmente 0,01% dos seguintes

carboidratos: arabinose, frutose, galactose, glicose, manitol, manose, maltose, sacarose, salicina e sorbitol. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas (DAVIS, 1955; KANDLER & WEISS, 1986).

4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Lactobacillus* spp. - através da Técnica multiplex PCR

As 265 amostras de *Lactobacillus* que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos indicadores, através dos métodos de antagonismo “spot on the lawn” e de antagonismo simultâneo de difusão em poços, foram submetidas à identificação das espécies¹, através da biologia molecular pela Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando sequências de oligonucleotídeos para espécies do grupo *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. fermentum* e *L. salivarius* descrito por Song et al. (2000). Seguiu-se o protocolo de extração e quantificação do DNA bacteriano, normalização e amplificação das amostras, e detecção do produto amplificado (eletroforese) realizado segundo a metodologia de Oliveira et al. (2002).

4.6 AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Quatrocentos e setenta e quatro amostras de *Lactobacillus* foram

¹ Laboratório de Biologia Molecular - Departamento de Patologia FMB - UNESP - Botucatu.

processadas através do método de antagonismo “spot on the lawn” frente a microrganismos indicadores (Tabela 1). As culturas que apresentaram efeito inibitório, observadas através da formação do halo, foram então submetidas a nova prova de atividade antimicrobiana pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços, utilizando-se os sobrenadantes ativos livres de células, esterilizados por microfiltração com membrana de poro Millex-GV de 0,22µm e 25mm de diâmetro (Mllipore).

Tabela 1 – Microrganismos utilizados como indicadores para os testes de atividades antimicrobianas das espécies de *Lactobacillus* spp.

MICROORGANISMOS INDICADORES	ORIGEM
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 8750	CCT 1496*
<i>E. faecium</i> ATCC 6569	CCT
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	CCT 3750
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	CCT
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	CCT 3434
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> ATCC 4797	CCT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	CCT
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	USP**
<i>Salmonella</i> Enteritidis fagotipo 4	UNESP***
<i>S. Enteritidis</i> fagotipo 28	UNESP
<i>S. Typhimurim</i>	UNESP
<i>S. Pullorum</i>	UNESP

*Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas - SP.

**Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

***Laboratório de Ornitopatologia (UNESP - FMVZ - Campus Botucatu).

4.6.1 Método de Antagonismo “spot on the lawn”

Utilizou-se o método de antagonismo “spot on the lawn” modificado de

acordo com Harris et al. (1989). As amostras de *Lactobacillus* foram semeadas em caldo MRS, incubadas a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Posteriormente alíquotas dessas culturas foram adicionadas (forma de pontos) em placas de Petri contendo ágar MRS. Após a completa secagem, as placas foram incubadas em condições de aerobiose a 37°C por 18 horas.

4.6.1.1 Cultivos dos Microrganismos Indicadores: os microrganismos indicadores foram semeados em tubos contendo 5mL de caldo MRS para as bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* e *Enterococcus*) e 5mL de caldo de Infusão Cérebro e Coração (ICC - OXOID) para as demais (*Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella*), sendo em seguida incubados em aerobiose a 37°C por 12 horas. Posteriormente, transferiu-se 200µL de cada cultura para novos tubos contendo 20mL de caldo ICC acrescido de 0,75% de ágar-ágar (OXOID), previamente preparado e mantido em banho-maria a 45°C (SANTOS, 1993).

4.6.1.2 Plaqueamento: a cultura de cada um dos microrganismos indicadores, obtidos na etapa anterior (4.6.1.1), foi vertido cuidadosamente nas placas incubadas anteriormente com as amostras de *Lactobacillus* (4.6.1). Após a completa solidificação da camada superior, as placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras de *Lactobacillus* que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos indicadores, observados através das zonas de inibição

(formação de halo), foram estocadas a -196°C em caldo nutriente com 10% de glicerol.

4.6.2 Método de Antagonismo Simultâneo de Difusão em Poços

As 265 amostras de *Lactobacillus* que apresentaram efeito inibitório frente a microrganismos indicadores pelo método de antagonismo “spot on the lawn”, foram submetidas a nova prova de atividade antimicrobiana pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços descrito por Lewus & Montville (1991). A atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células foi verificada através da formação de halo e mensurados da borda do orifício (poço) até o final da zona de inibição (mm).

4.6.2.1 Cultivo dos Microrganismos Indicadores: os microrganismos indicadores foram semeados em tubos contendo 5mL de caldo MRS para bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* e *Enterococcus*) e 5mL de ICC para as demais (*Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella*), sendo em seguida incubados em aerobiose a 37°C por duas horas.

4.6.2.2 Extração das Bacteriocinas: as 265 amostras de *Lactobacillus* que apresentaram efeito inibitório pelo método de antagonismo “spot on the lawn” foram semeadas em tubos contendo 10mL de caldo MRS modificado, ou seja, acrescido com apenas 0,05% de glicose e incubados em

aerobiose a 37°C por 18 horas. A extração de bacteriocinas foi realizada por meio de centrifugação a 7000rpm por 10 minutos, dos sobrenadantes livres de células ajustou-se o pH para 5,5 (NAOH 10N) e realizou-se a microfiltração com membrana de poro Millex-GV de 0,22µm e 25mm de diâmetro (Millipore). As amostras dos sobrenadantes foram estocadas a temperatura de 8°C para posterior utilização.

4.6.2.3 Plaqueamento: vinte microlitros da cultura dos microrganismos indicadores (sorotipos de *Salmonella*), foram transferidos a 20mL de ágar entérico de Hektoen (OXOID) e também em 20mL de XLD (ágar com xilose, lisina e desoxicolato - OXOID)). Enquanto em 20mL de caldo ICC acrescido com 0,75% de ágar-ágar, transferiu-se vinte microlitros dos microrganismos indicadores *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Listeria*. O conteúdo de cada cultura foi vertido em placas de Petri e após a completa solidificação, poços de 6mm foram perfurados. Sessenta microlitros dos sobrenadantes livres de células das 265 amostras de *Lactobacillus* produtoras de inibição (4.6.2.2), foram depositados em cada poço. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas.

Cento e quarenta e uma amostras de *Lactobacillus* que confirmaram efeito inibitório pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços, foram novamente processadas pelos procedimentos anteriormente citados. Porém, nesta etapa, a incubação foi realizada em condições de anaerobiose a 37°C por 24 horas para descartar a possível ação do peróxido de hidrogênio. O

antagonismo foi detectado pela presença de zonas de inibição e mensurados da borda do orifício até o final da zona de inibição.

4.7 DETECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

Utilizou-se o método de “sandwich” modificado de acordo com Hechard (1990) para as 53 amostras de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocinas. As culturas foram semeadas (forma de pontos) em placas de Petri contendo ágar MRS e incubadas a 37°C por 12 horas. Posteriormente, adicionou-se camada de ágar nutriente que, após solidificação foi seguida da adição de ágar semi-sólido de ICC contendo os respectivos microrganismos indicadores. As placas foram incubadas novamente a 37°C por 24 horas. A ação dos bacteriófagos seria observada pela ausência da inibição (não formação de halo).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.8.1 Teste do Qui-quadrado

Os estudos da inibição dos microrganismos indicadores frente as amostras de *Lactobacillus reuteri*, *L. salivarius* e *L. spp.* foram realizados pela comparação de proporções entre os locais de isolamento (inglúvio e cecos) através do teste do Qui-quadrado ou o Exato de Fisher quando necessário (ZAR, 1996).

... Como um velho boiadeiro levando a
boiada, eu vou tocando os dias pela longa estrada,
eu vou. Estrada eu sou...

(Almir Sater e Renato Texeira)

RESULTADOS

5 RESULTADOS

1.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *Lactobacillus*

5.1.1 Provas Bacteriológicas

Através das características morfológicas e fisiológicas, identificou-se 474 amostras bacterianas como sendo do gênero *Lactobacillus*. As amostras isoladas do ingluvío e cecos das aves foram caracterizadas como reação de KOH negativa, bastonetes Gram-positivos, curtos e longos, prova de catalase negativa e com produção ou não de gás a partir de glicose, enquadrando-se nos grupos hetero e homofermentativos.

5.1.2 Fermentação dos Carboidratos

A identificação das 474 amostras através da fermentação dos carboidratos arabinose, frutose, galactose, glicose, manitol, manose, maltose, sacarose, salicina e sorbitol, apresentaram características para o gênero *Lactobacillus*.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Lactobacillus* spp. – através da técnica multiplex PCR

Através da técnica multiplex PCR, todas as amostras de *Lactobacillus* que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos indicadores Gram-positivos e Gram-negativos nos dois métodos de antagonismo utilizados (“spot on the lawn” e difusão em poços), foram identificadas como sendo 132 da espécie *Lactobacillus reuteri*, 45 de *L. salivarius* e 88 *Lactobacillus* spp.

5.3 PROVA DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1 Método de Antagonismo “spot on the lawn”

Das 474 amostras identificadas como sendo do gênero *Lactobacillus*, 265 apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos indicadores utilizados, detectada através das zonas de inibição no método de antagonismo “spot on the lawn” (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana das amostras de *Lactobacillus* frente a microrganismos indicadores demonstrada pelo método de antagonismo “spot on the lawn”.

Microrganismos indicadores	Inibição através da atividade antimicrobiana	Percentual (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	167 / 265*	63
<i>E. faecium</i>	171 / 265	64
<i>Lactobacillus casei</i>	133 / 265	51
<i>L. helveticus</i>	119 / 265	44
<i>L. fermentum</i>	95 / 265	35
<i>L. delbrueckii</i>	115 / 265	43
<i>Staphylococcus aureus</i>	173 / 265	65
<i>Listeria monocytogenes</i>	169 / 265	63
<i>Salmonella</i> Enteritidis fagotipo 4	192 / 265	72
<i>S. Enteritidis</i> fagotipo 28	176 / 265	66
<i>S. Typhimurium</i>	174 / 265	65
<i>S. Pullorum</i>	163 / 265	61

* Número de amostras positivas em relação ao número total de amostras de *Lactobacillus* spp.

O número de microrganismos indicadores sensíveis frente as amostras de *Lactobacillus*, demonstrada na Tabela 2, indica que as espécies de *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e todos os sorotipos de *Salmonella* apresentaram maior sensibilidade quando comparados às espécies de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* e *L. helveticus*) (Figuras 1 a 4).



Figura 1 – Ação das substâncias antimicrobianas de *Lactobacillus salivarius*, frente a *Enterococcus faecalis* como microrganismo indicador, em meios BHI e MRS.

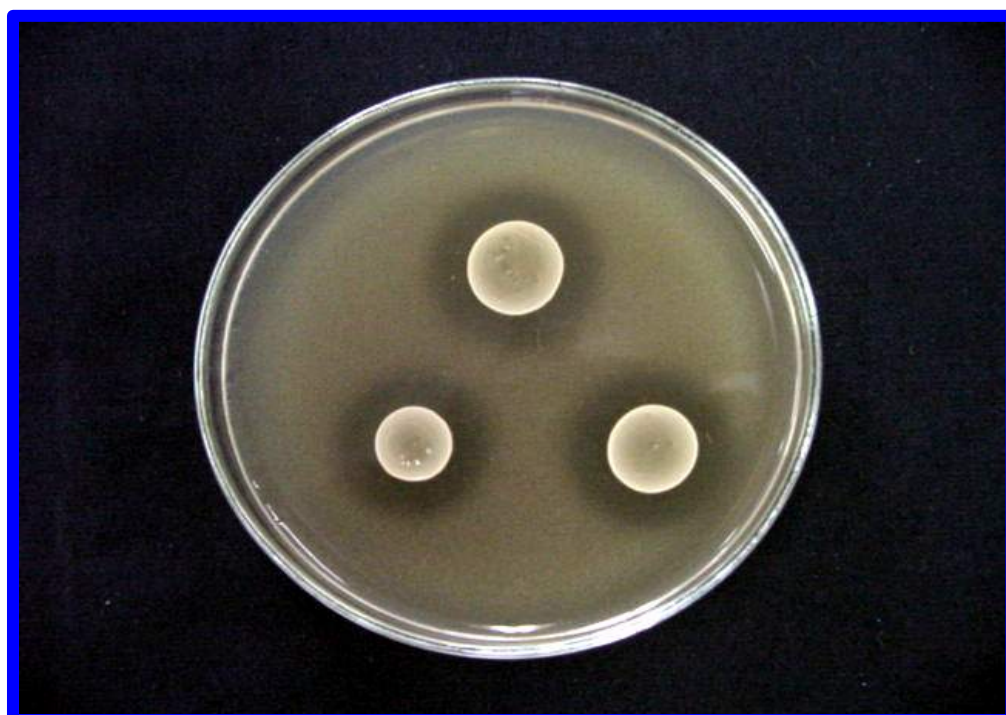


Figura 2 – Ação das substâncias antimicrobianas de *Lactobacillus reuteri*, frente a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 como microrganismo indicador, em meios BHI e MRS.



Figura 3 – Ação de substâncias antimicrobianas de *Lactobacillus reuteri*, frente a *Lactobacillus helveticus* como microrganismo indicador, em meios BHI e MRS.



Figura 4 – Ação de substâncias antimicrobianas de *Lactobacillus salivarius*, frente a *Salmonella* Typhimurium como microrganismo indicador, em meios BHI e MRS.

5.3.2 Método de Antagonismo Simultâneo de Difusão em Poços - realizado em condições de aerobiose

Das 265 amostras de *Lactobacillus* que apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos indicadores pelo método de antagonismo “spot on the lawn”, 141 demonstraram ação antagônica através dos sobrenadantes livres de células frente a microrganismos indicadores no método de antagonismo simultâneo de difusão em poços com incubação em aerobiose. A ação antagônica das 141 amostras de *Lactobacillus* através das zonas de inibição, foi observada nos microrganismos *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e todos os sorotipos de *Salmonella* (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade das substâncias antimicrobianas produzidas pelos *Lactobacillus* frente a microrganismos indicadores, pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços com incubação em aerobiose.

Microrganismos indicadores (sensíveis)	Inibição através da atividade antimicrobiana (formação de halo)
<i>Enterococcus faecalis</i>	40 / 141*
<i>E. faecium</i>	9 / 141
<i>Lactobacillus casei</i>	0 / 141
<i>L. helveticus</i>	0 / 141
<i>L. fermentum</i>	0 / 141
<i>L. delbrueckii</i>	0 / 141
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 / 141
<i>Listeria monocytogenes</i>	95 / 141
<i>Salmonella</i> Enteritidis fagotipo 4	10 / 141
<i>S. Enteritidis</i> fagotipo 28	22 / 141
<i>S. Typhimurium</i>	10 / 141
<i>S. Pullorum</i>	9 / 141

* Número de amostras positivas em relação ao número total de amostras de *Lactobacillus* spp.

5.3.3 Método de Antagonismo Simultâneo de Difusão em Poços - realizado em condições de anaerobiose

Das 141 amostras de *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana frente a microrganismos indicadores no método de difusão em poços com incubação em aerobiose, 53 amostras confirmaram inibição aos mesmos microrganismos indicadores, utilizando-se a incubação em condições de anaerobiose (Tabela 4). A atividade antimicrobiana devido a ação das bacteriocinas, foi demonstrada através das zonas de inibição ao redor dos poços (Figuras 5 a 8).

Tabela 4 – Ação de bacteriocinas produzidas pelos *Lactobacillus*, frente a microrganismos indicadores através do método de antagonismo simultâneo de difusão em poços, com incubação em anaerobiose.

Microrganismos indicadores (sensíveis)	Inibição através da ação de bacteriocinas	Percentual (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	33 / 53*	62
<i>E. faecium</i>	3 / 53	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 / 53	18
<i>Lactobacillus casei</i>	0 / 53	
<i>L. helveticus</i>	0 / 53	
<i>L. fermentum</i>	0 / 53	
<i>L. delbrueckii</i>	0 / 53	
<i>Listeria monocytogenes</i>	34 / 53	64
<i>Salmonella</i> Enteritidis fagotipo 4	10 / 53	18
<i>S. Enteritidis</i> fagotipo 28	14 / 53	26
<i>S. Typhimurium</i>	11 / 53	20
<i>S. Pullorum</i>	2 / 53	3

* Número de amostras positivas em relação ao número total de amostras de *Lactobacillus* spp produtoras de bacteriocinas.

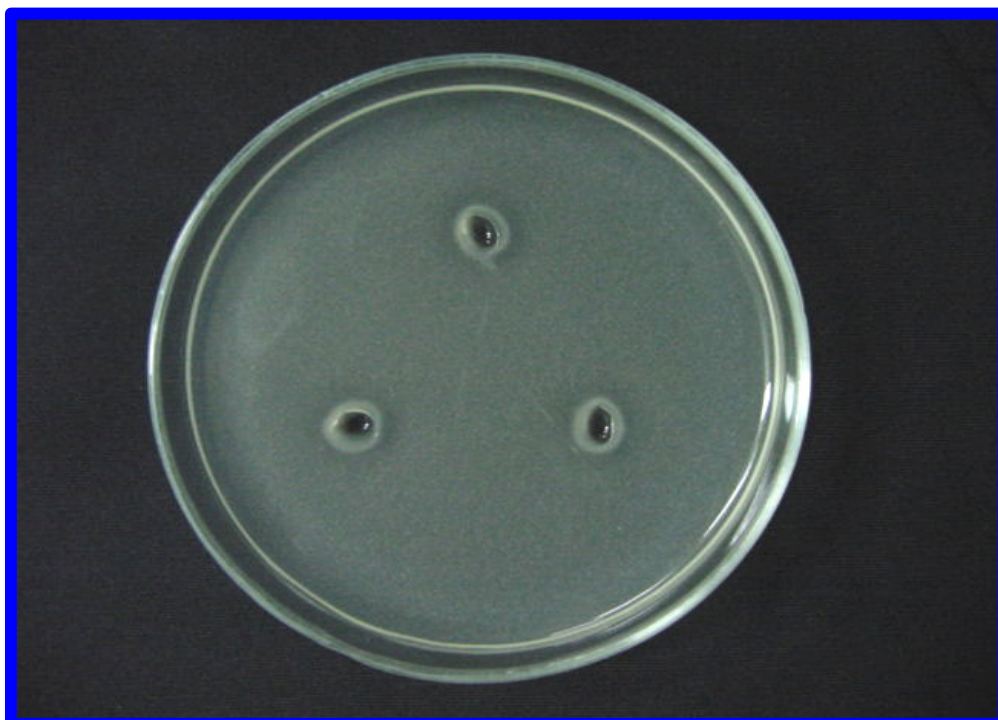


Figura 5 – Ação das bacteriocinas de *Lactobacillus reuteri* frente a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 como microrganismo indicador, em meio BHI.



Figura 6 – Ação das bacteriocinas de *Lactobacillus reuteri* frente a *Listeria monocytogenes* como microrganismo indicador, em meio BHI.

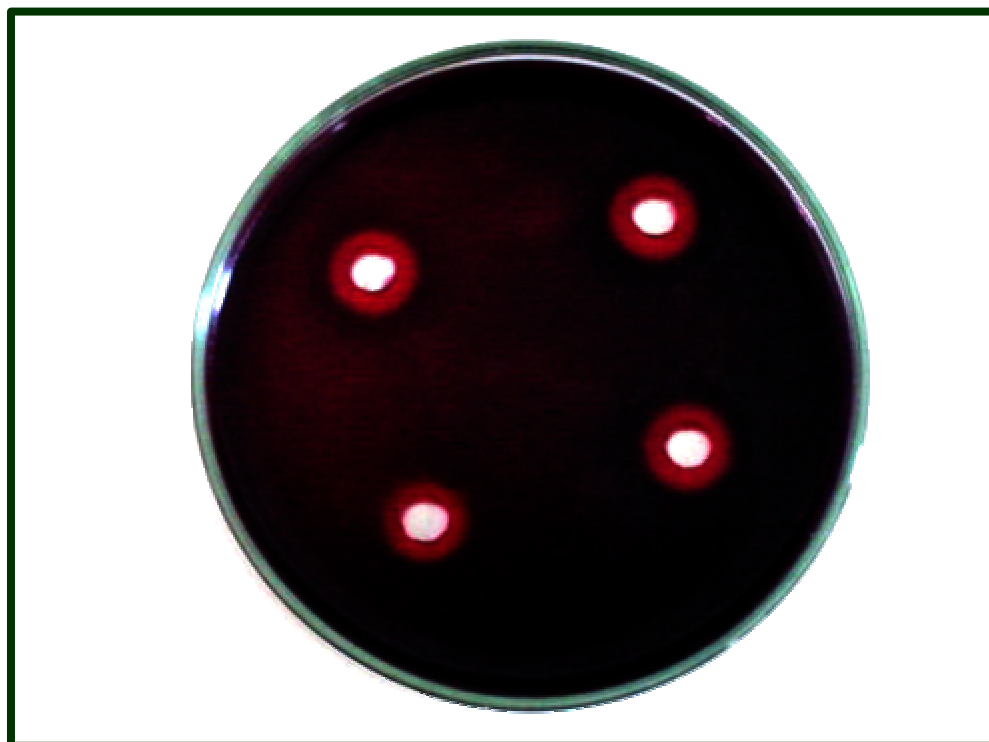


Figura 7 – Ação das bacteriocinas de *Lactobacillus reuteri* frente a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 como microrganismo indicador, em meio Hektoen.



Figura 8 – Ação das bacteriocinas de *Lactobacillus salivarius* frente a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 28 como microrganismo indicador, em meio Hektoen.

Cinquenta e três amostras de *Lactobacillus*, sendo 30 de *Lactobacillus reuteri*, 12 de *L. salivarius* e 11 de *L. spp.* foram caracterizadas como produtoras de bacteriocinas, com atividade antimicrobiana frente a microrganismos indicadores Gram-positivos (*Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Listeria*) e Gram-negativos (*Salmonella*), detectadas através da zona de inibição e mensuradas da borda do orifício até o final da zona de inibição (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 5 – Diâmetro dos halos das amostras de *Lactobacillus reuteri* produtoras de bacteriocinas.

Microrganismos indicadores	Quantidade de amostras	Diâmetro dos halos (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	19 / 30 *	1,4 **; 1,0; 1,4; 2,7; 3,0; 2,0; 1,4; 1,4; 1,4; 1,0; 1,8; 1,0; 1,4; 1,0; 2,0; 1,0; 1,0; 1,4; 1,4
<i>Enterococcus faecium</i>	3 / 30	1,4; 1,4; 1,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 / 30	1,3; 1,8; 1,0; 1,4; 1,4; 2,0; 1,4; 1,0; 1,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	16 / 30	1,6; 1,0; 1,4; 4,0; 4,0; 5,5; 5,8; 1,0; 1,0; 1,0; 2,0; 4,2; 5,0; 1,0; 1,4; 3,0
<i>Salmonella</i> Enteritidis fag. 4	7 / 30	2,0; 3,0; 4,2; 1,7; 1,0; 1,4; 3,0
<i>Salmonella</i> Enteritidis fag. 28	5 / 30	5,0; 2,0; 1,0; 1,0; 2,0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10 / 30	2,0; 5,0; 1,8; 5,0; 1,4; 3,0; 2,5; 3,0; 4,5; 4,0

* Número de amostras positivas em relação ao número total de amostras de *Lactobacillus reuteri*.

** Média das quatro repetições.

Tabela 6 – Diâmetro dos halos das amostras de *Lactobacillus salivarius* produtoras de bacteriocinas.

Microrganismos indicadores	Quantidade de amostras	Diâmetro dos halos (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9 / 12 [*]	2,0 ^{**} ; 2,0; 2,0; 2,0; 2,4; 1,4; 2,4; 2,0; 2,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	9 / 12	2,4; 2,0; 2,4; 3,0; 3,0; 4,0; 3,0; 2,4; 2,4
<i>Salmonella</i> Enteritidis fag. 4	3 / 12	1,4; 1,0; 1,5
<i>Salmonella</i> Enteritidis fag. 28	5 / 12	3,0; 3,4; 6,0; 1,4; 2,0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1 / 12	2,4
<i>Salmonella</i> Pullorum	1 / 12	3,4

* Número de amostras positivas em relação ao número total de amostras de *Lactobacillus salivarius*.

** Média das quatro repetições.

Tabela 7 – Diâmetro dos halos das amostras de *Lactobacillus* spp. produtoras de bacteriocinas.

Microrganismos indicadores	Quantidade de amostras	Diâmetro dos halos (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 / 11 [*]	4,0 ^{**} ; 2,0; 2,0; 1,0; 3,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 / 11	1,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	9 / 11	4,0; 2,4; 3,0; 2,4; 3,0; 2,0; 2,0; 4,0; 4,0
<i>Salmonella</i> Enteritidis fag. 28	4 / 11	2,5; 2,0; 2,0; 2,0
<i>Salmonella</i> Pullorum	1 / 12	3,4

* Número de amostras positivas em relação ao número total de amostras de *Lactobacillus* spp.

** Média das quatro repetições.

5.4 MÉTODO DE “SANDWICH” – Detecção de Bacteriófagos

Todas as 53 amostras de *Lactobacillus* que apresentaram atividade antimicrobiana no método de difusão em poços com incubação em anaerobiose, confirmaram ação antagônica através das zonas de inibição no método de “sandwich” frente aos mesmos microrganismos indicadores.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.5.1 Teste do Qui-quadrado

Do estudo da inibição dos microrganismos indicadores (Gram-positivos e Gram-negativos) frente as amostras de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocina, foi realizado comparação de proporções entre os cecos e inglúvio pela aplicação do teste do Qui-quadrado (ZAR, 1996) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Proporções das amostras de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocina, que inibiram os microrganismos indicadores Gram-positivos em relação ao local de isolamento, sendo 33 amostras provenientes dos cecos e 20 do inglúvio.

Local	Microrganismos indicadores (sensíveis)			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Cecos	0,72	0,03	0,18	0,57
Inglúvio	0,50	0,10	0,20	0,70
Estatística	$X^2 = 1,82$	$X^2 = 0,40$	$X^2 = 0,08$	$X^2 = 0,38$
Valor do P	P= 0,17	P= 0,55	P= 0,96	P= 0,54

Tabela 9 – Proporções das amostras de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocina, que inibiram os microrganismos indicadores Gram-negativos em relação ao local de isolamento, sendo 33 amostras provenientes dos cecos e 20 do Inglúvio.

Local	Microrganismos indicadores (sensíveis)			
	<i>Salmonella</i> Enteritidis fag 4	<i>Salmonella</i> Enteritidis fag 28	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Pullorum
Cecos	0,18	0,21	0,30	0,03
Inglúvio	0,20	0,35	0,15	0,00
Estatística	$X^2 = 0,08$	$X^2 = 0,61$	$X^2 = 0,86$	$X^2 = 0,86$
Valor do P	P= 0,96	P= 0,43	P= 0,36	P= 0,36

... Todo mundo ama um dia, todo mundo chora um dia. Agente chega e outros vão embora...

(Almir Sater e Renato Texeira)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus* fazem parte da microbiota das aves. Essas e outras bactérias encontram-se em todo o trato gastrointestinal, mas em diferentes quantidades e espécies, em função das diferentes localizações (HILL, 1990; BAQUERO, 1992; BOURLIOUX, 1994). Neste estudo, amostras do gênero *Lactobacillus* e das espécies *L. reuteri* e *L. salivarius* isoladas do ingúvio e cecos de aves, demonstraram através de métodos específicos de difusão (“spot on the lawn” e difusão em poços) capacidade inibitória frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, pela ação de substâncias antagônicas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

Os *Lactobacillus* isolados de diversas fontes podem ser importantes na produção de probióticos e estes por sua vez têm o propósito de manter a microbiota intestinal equilibrada através da exclusão competitiva e por ação antagônica a diversas bactérias patogênicas presentes no intestino das aves (GUSILIS et al., 1999). São muitas as bactérias e leveduras que podem ser utilizadas como probióticos (PIVNICK et al., 1985), cuja seleção é realizada pela avaliação de seus metabólitos, potencial de colonização e capacidade de multiplicação em locais específicos (FRETER et al., 1983). Desta forma propiciam efeitos benéficos a saúde do hospedeiro, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (TANNOCK, 1999).

Na avicultura, espécies de *Lactobacillus* são utilizadas como probióticos, as quais produzem uma variedade de substâncias antimicrobianas (MICHAEL et al., 1997), principalmente as substâncias protéicas denominadas de bacteriocinas. Através do método de difusão em poços, utilizando os sobrenadantes livres de células das espécies de *Lactobacillus*, demonstrou-se ação antagônica das bacteriocinas, verificada através das zonas de inibição frente aos microrganismos indicadores dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella* (Tabela 4).

A utilização dessas e outras bactérias ácido lácticas como probióticos, e também sua aplicação como conservantes em alimentos aumenta o interesse para identificação e/ou classificação dos diferentes gêneros, com base na morfologia, características da fermentação de glicose, habilidade de crescimento em diferentes temperaturas e em altas concentrações salinas, diferenças no metabolismo envolvendo a produção de ácido láctico e tolerância a condições ácidas e alcalinas (AXELSSON, 1993).

O crescimento de *Lactobacillus* envolve diversificada necessidade nutricional, pois essas bactérias são bastante fastidiosas, requerendo carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, compostos orgânicos como fonte de energia e sais minerais (HOLT et al., 1984, 1989).

As condições de crescimento a certa temperatura também é importante para sua multiplicação. Collins & Hartlein (1982) evidenciaram o crescimento de cepas de *Lactobacillus acidophyllus* a diferentes temperaturas, variando entre mínimas de 19°C a 22°C e máximas de 47°C a

51°C. Neste estudo, a temperatura ótima para o crescimento das amostras de *Lactobacillus* foi de 37°C em anaerobiose, quando comparada às incubações a 25°C e 40°C.

Embora em taxonomia bacteriana a utilização da morfologia como característica chave seja questionável para a identificação das bactérias ácido lácticas, a análise morfológica é muito importante para avaliação preliminar de culturas bacterianas (SCHILLINGER & LUCKE, 1987; AXELSSON, 1993). Schillinger & Lucke (1987), propuseram um esquema baseado nas diferenças do perfil de fermentação de alguns carboidratos para identificação das espécies de *Lactobacillus* e Sharpe (1981), nas características fenotípicas através de testes fisiológicos.

Nesta pesquisa, as colônias que apresentaram aspecto cremoso, cor branca e bordas bem delimitadas foram submetidas a provas fisiológicas e bioquímicas. No teste de KOH a 3%, a não formação de gel viscoso na lâmina, caracterizava as células Gram-positivas com reação KOH negativa. À confirmação pela coloração de Gram, evidenciou-se bactérias Gram-positivas na forma de bastões longos e curtos. Com a prova de catalase, todas as colônias na presença de peróxido de hidrogênio demonstraram a não formação de bolhas. A diferenciação do gênero *Lactobacillus* dentro do grupo hetero e homofermentativos, foi evidenciada pelo teste fisiológico de produção de gás a partir de glicose.

De acordo com Axelsson (1993), uma característica importante

utilizada para diferenciação dos grupos das bactérias ácido lácticas é a forma de fermentar a glicose sob condições padronizadas. Na prática, um teste de produção de gás a partir da fermentação de glicose em caldo MRS contendo tubos de Durhan, permite diferenciar esses dois grupos. Essas bactérias são divididas dentro de dois grupos fisiológicos, as heterofermentativas com produção de CO₂, ácidos láctico e acético, etanol e manitol pela fermentação da glicose e as homofermentativas com produção apenas de ácido láctico

O gênero *Lactobacillus* foi dividido dentro de três grupos de acordo com os resultados da produção de gás e teste da produção de amônia, baseados nos critérios taxonômicos de Axelsson (1998), onde o grupo I- representa *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos com arginina negativa, grupo II- *Lactobacillus* obrigatoriamente heterofermentativo com arginina negativa e o grupo III- *Lactobacillus* obrigatoriamente heterofermentativo, mas com arginina positivo.

A fermentação dos carboidratos utilizados neste estudo para diferenciação das espécies, mostrou-se ineficiente, pois muitas amostras foram classificadas como *Lactobacillus* spp. Schillinger & Lucke (1987) enfatizaram que muitas cepas de espécies diferentes e também da mesma espécie apresentaram propriedades fisiológicas iguais. Através das características morfológicas, junto com as provas bacteriológicas e fisiológicas foi possível a seleção preliminar de um grande número de amostras bacterianas do gênero *Lactobacillus*.

Segundo Kandler & Weiss (1986), o gênero *Lactobacillus* é composto

por mais de 60 espécies, e sua identificação baseada em critérios fisiológicos e bioquímicos torna-se ambígua e complicada.

A utilização do teste de fermentação de carboidratos usados como modelo padrão para identificação dessas bactérias, ajuda na identificação, porém em muitos casos não é possível a confirmação sem a seqüência de DNA contendo G + C (GASSER, 1970), principalmente para espécies de *Lactobacillus acidophyllus*, porque são fenotipicamente similares com as espécies de *Lactobacillus johnsoni*, *L. crispatus*, *L. gasser*, *L. amylovorus* e *L. galinarum* (SCHILLINGER, 1999). Isto propicia que alguns probióticos contenham cepas erroneamente classificadas como *Lactobacillus acidophyllus*, verificadas através de experimentos com hibridização de DNA, onde foi verificado que amostras de *L. acidophyllus* foram classificadas como *L. Johnson* e *L. crispatus* (BERNET-CAMARD et al., 1997).

Para algumas espécies de *Lactobacillus* de grupo fenotipicamente similares, somente a hibridização do DNA poderá demonstrar definitivamente esta afinidade (SCHILLENGER & LUCKE, 1987).

Baseado no locus 16S do rRNA, Collins et al. (1991) concluíram que o gênero *Lactobacillus* pode ser dividido em três grupos, sendo o primeiro grupo, composto por *Lactobacillus delbrueckii* e muitos outros obrigatoriamente homofermentativos, como *L. acidophyllus* e espécies relacionadas, o segundo grupo denominado de *Lactobacillus casei* grupo *Pediococcus* e o terceiro e mais vasto, compreendendo 30 espécies de *Lactobacillus*. As mais conhecidas são *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L.*

sake e *L. salivarius* (SCHLEIFER et al., 1993).

Com o auxílio da Técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando primers específicos para as espécies, podemos apresentar neste trabalho cepas corretamente identificadas, produtoras de bacteriocinas e com ação antimicrobiana frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Tabelas 5, 6 e 7).

O interesse pela identificação dessas bactérias ácido lácticas e os estudos sobre fisiologia, bioquímica e genética tiveram avanço significativo, levando a detecção de compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose como as bacteriocinas (DAVIDSON & HOOVER, 1993).

Segundo Klaenhammer (1988) o espectro de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas é limitado às bactérias Gram-positivas. Uma explicação para este fato seria a presença de ácidos lipoteicóicos na membrana plasmática dessas bactérias (DESMAZEAUD, 1997). A inibição de bactérias estritamente relacionadas à produtora é verdadeiro em muitos casos, mas foi demonstrado que muitas proteínas antimicrobianas produzidas por Gram-positivas são efetivas frente a muitos gêneros de Gram-positivas e em alguns casos também Gram-negativas (MONTVILLE & KAISER, 1993).

O gênero *Lactobacillus* produz metabólitos que inibem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GIBSON & ROBERFROID, 1995). A eficácia e o espectro de ação contra microrganismos patogênicos ocorrem

devido a ação de bacteriocinas e uma gama de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriófagos (GILLILAND & SPECK, 1972).

A presença de bacteriófagos integrados ao DNA das cepas produtoras de bacteriocinas, promove ação semelhante as substâncias antimicrobianas (protéicas), dificultando a diferenciação e interferindo na avaliação dos resultados (MAYR-HATING et al., 1972; TAGG et al., 1976). Uma maneira de impedir a difusão de bacteriófagos é semear a cultura indicadora no lado reverso do ágar onde foi semeada a cepa produtora. Neste estudo a utilização da técnica “sandwich” com adição do ágar nutriente, entre as amostras produtoras e os microrganismos indicadores, demonstrou após incubação, a formação das zonas de inibição, confirmando assim a ação das bacteriocinas. Esta técnica dificulta a ação dos bacteriófagos através da difusão.

Além de excluir o efeito inibitório por ação dos bacteriófagos, também excluiu-se a ação dos ácidos orgânicos, ao utilizar-se o meio de cultura MRS modificado, através do acréscimo de apenas 0,05% de glicose e ajuste do pH a 5,5, diminuindo assim a fermentação e conseqüentemente a produção de ácidos. O efeito dos peróxidos de hidrogênio foi eliminado através da incubação em anaerobiose. As zonas de inibição formadas por algumas amostras de *Lactobacillus* com incubação em aerobiose foi devido provavelmente a ação dos peróxidos de hidrogênio e/ou bacteriocinas (Tabela 3), pois com incubação em anaerobiose o número de amostras

produtoras de zonas de inibição diminuiu, confirmando assim a ação de bacteriocinas frente a microrganismos indicadores Gram-positivos e Gram-negativos (Tabela 4).

Algumas amostras de *Lactobacillus* apresentaram ação inibitória a cepas homólogas (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. helveticus*) no método de antagonismo “spot on the lawn” (Figura 5), o mesmo não ocorrendo quando utilizou-se o método de difusão em poços. Resultados diferentes foram relatados por Toba et al., (1991), quando utilizando *Lactobacillus acidophyllus* LAPT 1060 isolados de fezes infantis como cultura produtora de bacteriocina frente a *Lactobacillus helveticus* NCFB 67 e *L. delbrueckii* subs *bulgaricus* NCFB 1979 como microrganismos indicadores, evidenciaram a sensibilidade através das zonas de inibição por ação de bacteriocinas pelo método de difusão em poços.

Diversas técnicas são utilizadas para detectar a produção de bacteriocinas baseadas na inibição do crescimento de microrganismo indicador por uma cepa teste produtora, com a difusão das bacteriocinas em meio de cultura sólido ou semi-sólido.

Os métodos mais utilizados denominam-se “well diffusion”, ou seja, difusão em poços, “flip streak” e “spot on the lawn”. O método de antagonismo “spot on the lawn” é mais reprodutível, rápido e de fácil interpretação, quando comparado aos outros métodos de antagonismo simultâneo. O método “flip streak” não apresentou praticidade, enquanto o método de difusão em poços apresentou um grande número de resultados

falso-negativos comparando com o método “spot on the lawn” (LEWUS & MONTVILLE, 1991).

Avaliando a atividade antimicrobiana das espécies de *Lactobacillus* estudadas, evidenciou-se que o método de antagonismo “spot on the lawn”, metodologia de seleção primária adaptada neste estudo, foi de grande importância para selecionar cepas produtoras de substâncias antagônicas, onde através da incubação preliminar das cepas produtoras durante 18 horas, visou-se o crescimento bacteriano, produção e difusão de bacteriocinas, assim como outros metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriófagos antes da inoculação e crescimento dos microrganismos indicadores, caracterizando o método de antagonismo não simultâneo. As amostras de *Lactobacillus* (produtoras) apresentaram inibição frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Tabela 2).

O método de antagonismo simultâneo de difusão em poços mostrou-se eficiente para avaliação da inibição (formação de halo), e as alterações introduzidas, em termos de meio de cultura específico para os sorotipos de *Salmonella*, podem ter influenciado no auxílio à ação de bacteriocinas.

Os sobrenadantes livres de células foram adicionados a poços perfurados em ágar previamente inoculado com os microrganismos indicadores. O método utilizado consistiu na incubação das amostras produtoras e cepas indicadoras simultaneamente em aerobiose, visando o crescimento da cepa produtora, produção e difusão das bacteriocinas e

outros metabólitos como peróxido de hidrogênio e bacteriófagos. A maioria dos microrganismos indicadores utilizados, com exceção das espécies de *Lactobacillus helveticus*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. casei*, onde a inibição foi nula, apresentaram sensibilidade aos sobrenadantes testados (Figuras 5 a 8).

Utilizando método de antagonismo simultâneo de difusão em poços com incubação em anaerobiose, excluindo-se a ação dos peróxidos de hidrogênio, foi possível demonstrar que as zonas de inibição formadas pelos sobrenadantes frente a microrganismos indicadores dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella* foi devido a ação das proteínas antimicrobianas (Tabela 4). Moreno et al. (1995), confrontando os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos com cepas de bactérias ácido lácticas (produtoras) pelo método de antagonismos simultâneo de difusão em poços, apresentaram resultados contrários, onde as cepas produtoras inibiram as espécies homólogas e outros microrganismos Gram-positivos, mas não foi observada nenhuma inibição para todos os microrganismos Gram-negativos examinados.

Bacteriocinas de *Lactobacillus* (acidofilina e lactocidina) exibem um espectro de ação amplo a numerosos gêneros de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RAMMELSBURG & RADLER, 1990; JUVEN et al., 1991).

Para a seleção prévia das amostras de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocinas, testou-se a capacidade inibitória por ambos os métodos de antagonismo, como também a utilização de diferentes meios de cultura e

condições de crescimento. Desta forma, evidenciou-se algumas amostras de *Lactobacillus* produtoras de zonas de inibição frente a microrganismos indicadores, que apresentaram ação inibitória através dos ácidos orgânicos, outras por ação do peróxido de hidrogênio e outras pela ação de bacteriocinas.

Os métodos “spot on the lawn” e difusão em poços foram igualmente eficientes para observar a sensibilidade (formação de halo) das cepas indicadoras testadas, porém o tamanho do halo de inibição bacteriano variou de acordo com o método de antagonismo utilizado. Resultados idênticos foram observados por Rosa (1998), quando utilizados os mesmos métodos de antagonismo e comparando-se o diâmetro dos halos em relação a sensibilidade de microrganismos indicadores à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake 2a*, demonstrando diferenças nos diâmetros. A atividade de uma bacteriocina pode ser estimada a partir do tamanho das zonas de inibição produzidas em um teste de difusão (MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997).

No método de difusão em poços, a utilização de meios de culturas diferentes como ágar Hektoen e ágar XLD, para os microrganismos indicadores do gênero *Salmonella*, também determinou variações no tamanho das zonas de inibição ao redor dos poços (Figuras 5 a 8). A composição do meio de cultivo pode afetar a sensibilidade da linhagem indicadora.

Várias condições ambientais, incluindo pH, temperatura, aeração,

concentração de açúcar, capacidade tamponante do meio e o tempo de incubação afetam a produção e a efetividade das bacteriocinas (LEWUS, 1991). Mortvedt-Abildgaard et al. (1995) observaram que a lactocina S, produzida por cepa de *Lactobacillus sake*, aparentemente não afetava as células sensíveis quando os valores de pH do meio estavam acima de seis.

Mortvedt-Abildgaard et al. (1995), observaram que *Lactobacillus sake* L45 produziu 2000 a 3000 UA/mL de bacteriocinas com incubação a 35°C por 24 horas. Yang e Ray (1994) obtiveram uma produção de 5500 UA/mL de sacacina A em meio tripticase adicionado de glicose e extrato de levedura a 30°C, utilizando o *Lactobacillus sake* Lb 706 como cepa produtora de bacteriocina.

Neste estudo, a produção de bacteriocinas a 37°C por 18 horas em caldo MRS modificado das amostras do gênero *Lactobacillus* e das espécies de *L. reuteri* e *L. salivarius* isoladas do ingluvío e cecos de aves, foi evidenciada através das zonas de inibição aos microrganismos indicadores (Tabelas 4 a 7).

A busca e o isolamento de bactérias ácido lácticas, cuja ação mediada por substâncias extracelulares produtoras de antibióses (bacteriocinas), capazes de inibir microrganismos patogênicos, vêm sendo crescente e deve ser profundamente explorada pelos pesquisadores.

... Cada um de nós compõe a sua história.
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de
ser feliz...

(Almir Sater e Renato Texeira)

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Duzentas e sessenta e cinco amostras de *Lactobacillus* isoladas do inglúvio e cecos de aves, apresentaram atividade antimicrobiana por ação de substâncias antagônicas, sendo que 53 delas apresentaram zonas de inibição por ação de substâncias protéicas (bacteriocinas).
- As amostras de *Lactobacillus reuteri*, *L. salivarius* e *L. spp.* produtoras de bacteriocinas inibiram bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Listeria*) e bactérias Gram-negativas (sorotipos de *Salmonella*), mas não apresentaram ação antagônica às cepas do mesmo gênero (*Lactobacillus casei*, *L. delbruekii*, *L. fermentum* e *L. helveticus*).
- O método de antagonismo simultâneo de difusão em poços mostrou-se eficiente na seleção das amostras de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocinas, quando incubadas em condições de anaerobiose.

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai sozinho, nem
nos deixa só...

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS*

ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Rev. Educ. Contin.** - CRMV-SP., São Paulo, v.2, n.3, p.59-71, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, N.E.; RIBEIRO, R.A.; KONDO, N.; CURI, R.P. Use of anaerobic cecal microflora, Lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental, infection with *Salmonella* Typhimurum and *Salmonella* Enteritidis. **Braz. J. Microbiol.**, 31, p.107-112, ISSN.1517-8382, 2000.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VONWRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993, p.1-63.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology In: SALMINEN, S.; van WRIGHT. A. **Lactic acid bacteria microbiology and functional aspect**. 2. ed., New York: Marcel Dekker, 1998, p.1-72.

BAQUERO, F. Microflora normal del hombre. In: PEREA, E..J. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**. Doyma, 1992, p.31-39.

BENKERROOM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W.E.; TANTAQUIELARAKI.

* * ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.22p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. **Lett. Appl. Microbiol.**, London, v. 17, 1993, p.78-81.

BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, p.4121-4128, 1993.

BERNET-CAMARD, M.F.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L.; HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA 1 secretes a bacteriocin antibacterial substances active in vitro and in vivo. **Appl. and Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, p.2747-2753, 1997.

BOURLIOUX, P. Ecologie microbienne du tractus digestif humain. In: ROISSART, H.; LUQUET, F.M. (Ed.) **Bacteries Lactiques**. Lorica, 1994, p.369-381.

BRADLEY, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocinas. **Bacteriol. Rev.**, Washington, v.31, n.4, p.230-314, 1967.

BRINK, B.; MINEKUS, M.; VOSSEN, J.M.B.M.; LEER, R.J.; HUIST INTVELD, J.H.J. antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.77, p.140-148, 1994.

BRUNO, M.E.C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, p.2255-2259, 1992.

BRUNO, M.E.C. & MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, p.3003-3010, 1993..

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobiols for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.71, p. 1–20, 2001.

COCCONCELLI, P.S. Molecular aspects of *Lactobacillus* bacteriocins. **Ann. Microbiol. Enzimol.**, Milano, v.43, p.37-44, 1993.

COCONNIER, M.H.; BERNET, M.F.; CHAUVIERE, G.; SERVIN, A.L. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. **J. Diarrhoial Dis.**, Dhaka, v.11, p.235-242, 1993.

COLLINS, E.B.; HARTLEIN, K. Influences of temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 65, p.883-6, 1982.

COLLINS, M.D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J.A.E.; MARTINEZ-MURCIA, A.; PHILLIPS, B.A.; WILLIAMS, A.M.; WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **Fems. Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.77, p.5-12, 1991.

COLICINAS. **O que são colicinas**: 2003. Disponível em: < [http: / www. icb. umfg. br / ~ prodap / projetos / colicinas 1. html](http://www.icb.umfg.br/~prodap/projetos/colicinas1.html) >. Acesso em: 30 out. 2003.

COX, R.P. & THOMSEN, J.K. Computer-aided identification of lactic acid bacteria using API-50 CHL system. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.10, p.257-259, 1990.

DAHL, T.A.; MIDDEN, W.R.; HARTMEAN, P.E. comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by purified singlet oxygen. **J. of Bacteriol.**, Washington, v.171, p.2188-2194, 1989.

DAVEY, G.P. Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. **N. Z. J. Dairy Technol.**, Palmerston North, v.16, n. 920, p.187-190, 1981.

DAVIS, G.H. The classification of Lactobacilli from the human mouth. **J. Gen. Microbiol.**, London, v.13, p.481-493, 1955.

DAVIDSON, P.M. & HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S. & VON WRIGHT, A. (Eds). **Lactic acid bacteria**, New York: Marcel Dekker, 1993, p.127-159.

DAY, C.A. **Competitive exclusion in poultry**: a review. Worcestershire: Life-care Prod., 1992, p.18.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technol.**, Chicago, v.44, n.11, p.100-117, 1990.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Cercla**, n.8, p.38-43, 1997.

DYRES, G.A.; CLOETE, T.E.; VONHOLY, A. Identification of *Leuconostoc* species associated with the spoilage of vacuum packaged Vienna sausages by DNA-DNA hybridization. **Food Microbiol.**, New York, v.11, p.271-274, 1994.

EIJSSINK, V.G.H.; BRURBERG, M.B.; MIDDELHOVEN, P.H.; NES, I.F. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. **J. Bacteriol.**, v.178, p.2232-2237, 1996.

FOWLER, G.G. The potential of nisin. **Food Manuf. Acture**, London, v. 54, p.57-59, 1979.

- FOX, S.M. Probiotics: Intestinal inoculantes for production animals. **Vet. Med.**, n.8, v.83, p.:806-829, 1988..
- FULLER, R. Probiotics in mam and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-78, 1989.
- FRETER, R.; STAUFFER, E.; CLEVEN, D.; HOLDEMAN, L.V.; MOORE, E.C. Continous-flow culturesas in vitro models of the ecology of large intestinal flora. **Infect. Immunol.**, Thorofare, v.39, p.666-675, 1983.
- GARCERÁ, M.J.G.; ELFERINK, M.G.L.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. In vitro poreforming activity of the lantibiotic nisin role of protonmotive force and lipid composition. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.212, p.417-422, 1993.
- GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B.W. (Ed.) **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa State University Press, 1997, p.97-121.
- GASSER, F. Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. **J. Gen. Microbiol**, v.62, p.223-239, 1970.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, Bethesda, v.125, p.1401 – 1412, 1995.
- GILAROVÁ, R.; VOLDRICH, M.; DEMNERVÁ, K.; CEROVSKY, M.; DOBIAS, J. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.24, p.315-9, 1994.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Interactions of food starter cultures and food borne pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. **J. Milk Food Sechnol.**, Amsterdam, v.35: 307–310, 1972..
- GONZALES, B.; GLAASKER, E.; KONJI, E.R.S.; DRIESSEN, A.J.M.;

SUAREZ, J.E.; KONINGS, W.N. Bactericida mode of action of plataricin C. **Appl. Environ. Microbiol**, Baltimore, v.62, p.2701-2709, 1996.

GUSILS, C.; GONZALEZ, S.N.; OLIVER, G. Some probiotic propertes of chicken *Lactobacilli*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.45, p.981-987, 1999.

HARRIS, L.J.; DAESCHEYL, M.A.; STILES.; KLAENHAMMER. T.R. Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Ames, 52, n.6, p.384-887, 1989.

HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUISVELD, J.H.; FULLER, R. Selection of Strains for probiotics use. In: FULLER, R. **Probiotics the scientific bais**. London: Chapman and Hall, 1992. p.209-224.

HECHARD, Y.; DHEIBOMEZ, M.; CENATIEMPO, Y.; LETELLIER, F. Antagonismo of lactic acid bacteria from goats milk against pathogens strains assessed by the "sandwich method". **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.11, p.185-188, 1990.

HILL, M.J. Factors controlling the microflora of the healthy upper gastrointestinal tract. In: HILL, M.J., MARSH, P.D. **Human microbial ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.57-85.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; BERGEY, D.H.; SNEATH, P.H. A.; MAIR. N.S.; SHARPE, M.E; STALEY, J.T.; WILIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1984, v.1.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; BERGEY, D.H.; SNEATH, P.H. A.; MAIR. N.S.; SHARPE, M.E.; STALEY, J.T.; WILIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Willians and Wilkins, 1989, v.4.

HUMBERT, F.; LANDE, F.; LHOSPITALIER, R.; SALVAT, G.; BENNEJAAN, G. Effect of four antibiotic additives on the *Salmonella* contamination of

chicks protected by an adult cecal flora. **Avian Pathol.**, Huntingdon. v.20, p.577-584, 1991.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from acid bacteria. In: BRANEN, A.L. DAVIDSON, P.M. (Eds). *Antimicrobiol in J. Foods.*, New York: **Marcel Deckker**, 1983, p.327-351.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.59, n.2, 1995.

JOOSTEN, H.M.L.J.; NUNES, M.; DEVREESE, B.; BEEUMEN, J.; MARUGG, J.D. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, n.11, p.4220-4223, 1996.

KAISER, A.L.; MONTVILLE, T.J. Purification of bacteriocin bavarium MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, p.4525-4535, 1996.

KANDLER, O.; WEISS, R. Section 14, Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In: SNEATH, P.H.A.; MAINE, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.**, Baltimore: Willian and Wilkins, 1986, v.2, p.1208-1234.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, 70:337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocina produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.12, p.39-86, 1993.

KLAENHAMMER, T.R. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic Mandate. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.8, p.497-505, 1998.

KEKESY, D.A & PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. **Appl. Microbiol.**, Washington, v.20, n.2, p.283, 1970.

KOZAR, W.; BARDOWSKI, J.; DOBRZANSKI, W.T. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by *lactic streptococci*. **J. Dairy Res.**, London, v.45, n.2, p.247-257, 1978.

LETHBRIDGE, A.B. Natura rumen proteins of weapon against antibiotic resistance. Lethbridge Research Centre Advance, 20, Canadá: Agriculture, 1999. Disponível em:<<http://www>. Acesso em: 21 nov. 2002.

LEWUS, C.B. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. **New Brunswick**, p.153, 1991.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.13, p.145-150, 1991.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probitics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, Washington, v.147, p. 747 – 8, 1965.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia**: tecnologia das fermentações. São Paulo: Edgard Blucher, 1975, p.286.

MacDONALD, L.C.; McFEETERS, R.F.; DAESCHEL, M.A.; FLEMING, H.P. A diferencil medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.53, p.1382-1384, 1987.

MACHADO, J.N. Tendências atuais e futuras de colonizadores bacterianos intestinais na avicultura industrial. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AVIÁRIAS, 4., **Anais**: Campinas, 2000, p.18-27.

MAYR-HARTING, A; HEDGES, A. J.; BERKELEY, C. W. Methods for

studying bacteriocins. In: Norris, J.R. Riblons, D.W. Ed.: **Methods in microbiology**. New York: Academic Press Inc., 1972, v.7A.

METCHNIKOFF, E. **Prolongation of Life**. New York: Putnam and Sans, 1907.

McCORNICK, E..M. ; SAVAGE, D.C. Chareterization of *Lactobacillus* sp. Strain 100-37 from murine gastrointestinal tract. Ecology, plimid content, e antagonistic activity toward *Clostridium raumrim* H1. **Appl. and Enveron. Microbiol.**, Washington, v.46, n.5, p.1103, 1983.

MILLES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract, natural ways to prevent colionization by pathogens. In: **Altech Biotechnol. Feed Industry**, p.133-50, 1993.

MICHAEL, S. & WEI, S. Mack Dr.: *Escherichia coli* strain 2348/69 in vitro adhrian is reduced in the presence of a *Lactobacillus* species. **Gastroenterology, Philadelphia**, v.112 A, p.1042, 1997.

MOHAMED, G.E.; MALCOLM, A.S.; WOODBINE, M. Food antibiotic nisin comparative effects on *Erysipelotrix* and *Listeria*. In: WOODBINE, M. (Ed) **Antimicrobials and agriculture, London: Butterworths Pess**, , 1984, p. 435-442

MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. Antimicrobiol proteins: Classification nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R., (Ed) **Bacteriocins of lactic bacteria**, New York: Academic Press, 1993, p.1 -22,

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K.; LUSDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **Int. Dairy. J.**, Oxford, v.5, p.797-814, 1995.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically base preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**: Woshington: Fundantals and fortiersed ASM PRESS, 1997, p.557-577,

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococcus* e sua utilização, no procedimento de queijo Minas Frescal.**, 1995, Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORENO, I.; LERAYER, S.L.A.; BALDIN, S.L.V.; LEITÃO, F.F.M. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subs *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 19, p.23-28, 1999.

MORTVET-ABILDGAARD, C.I.; NISSEN-MEYER, J.; JELLE, B.; GRENOV.; SKAUGEN, M.; NES, I.F. Productium and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, n.1, p.175-179, 1995.

MOTLAGH, A.M.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Viability lass of foodborne by starter culture metabolies. **J. Food Prot.**, Ames, v.54, p.873-878, 1991.

NURMI, E.; RANTALA, M. Newaspects of *Salmonmella* infection in broiler production. **Nature**, Landom, v.241, p.210, 1973.

NURMI, E.; RANTALA, M. The influence of zinc bacitracin on the colonization of *Salmonella infantis* in the intestines of broiler chickens. **Res. Vet. Sci.**, London, v.17, p.24-7, 1974.

OLIVEIRA D.E. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe.** 2002. 117p. Tese

(Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ORLA-JENSEN, S. The main liness of the natural bacterial system. **J. Bacteriol**, Baltimore, v. 6, p.263, 1921.

PARRA, F.E. Eclusion competitiva in Salmonellosis: revision. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIARIA, 1994, Athens, 1994, **Anais.**, 1994, p.433-69.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw. Hill do Brasil, 1981, p.1072.

PIARD, J.C.; DELORME, F.; GIRAFFA, G.; COMMISSAIRE, J.; DESMAZEAUD, M. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. **Neth. Milk Dairy J.**, Wageningen, v.44, n.3/4, p.143-158, 1990.

PIVNICK, H.; BARNUM, D.; STAVRIC, S.; GLEESON, T.; BLANCHFIELD, B. Investigations on the use of competitive exclusion to control Salmonella in poutry. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SALMONELLA**, 1985, Philadelphia, Proceedings American Association of Avian Pathologists: University of Pensylvania, 1985, p.80-87.

POWERS, E.M. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, p.3756-3758, 1995.

PRADO, S.C.; SANTOS, M.L.W.; CARVALHO, R.C.; MOREIRA, C.E.; COSTA, O.J. Atividade antimicrobiana de bactérias de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.52, p.417-23, 2000.

PRICE, R.J.; LEE, J.S. Inhibition of *Pseudomonos* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. In: **J. Milk Food Techol.**, Ames, v.33, p.13–18, 1970.

ROSA, M.C. Caracterização de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake* isolada de produtos cárneos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóia. **Resumo**. São Paulo: ICMSF, 1998, res. A.8.1.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**, Ámsterdam, v.70, p.347-358, 1996.

SAMELIS, J.; TSAKALIDOU, E.; METAXOPOULOS, J.; KALANTTOPOULS, G. Differentiation of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* isolated from naturally fermented greek dry salami by SDS-PAGE of wholecell proteins. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.78, p.157-163, 1995.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.8, p.341-347, 1998.

SANTOS, W.L.M. **Aislamento y caracterizacion parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp.** 347, de origem cárnico. p.294, 1993. (Doutorado) - Universidade Complutense, Madrid.

SCHILLINGER, U.; LUCKER, F.K. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. **Food Microbiol.**, London, v.4, p.199-208, 1987.

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

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of *Lactobacilli* from novel-type

probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **Int. J. Food Microbiol.**, Washington, v.47, p.79-87, 1999.

SCHLEIFER, K.H.; LUDWIG, W.; AMANN, R.I. Nucleic acid probes. In: GOODFELLOW, M.; D'DONNELL, A.G. (Eds). **The new bacteriol systematics**, New York: Academic Press, 1993, p.463-510.

SCHVED, F.; HENSIS, Y.; JUVEN, B.J. Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bactericins pedion SJ-1 and nisin. **Int. J. Food Microbiol.**, Washington, v.21, p.305-14, 1994.

SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus*. In: STARR, M.P. (Eds). **The prokaryotes**, Berlin: Springer-Verlag, 1981, v.2, p.1653.

SILVA, E.N.; ANDREATTI FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos, na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE ÁVICOLA. 2., 2000, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria, 2000, p.45-55.

SONG Y.L.; KATO, N.; LIU, C.X.; MATSUMIYA, Y.; KATO, H.; WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS. Microbiol. Lett.**, Amsterdam., v.187, p.167-173, 2000.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.57, p.3612-3615, 1991.

TAGG, J.R.; MCGIVEN, A.R. Assay System for bacteriocins. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.21, p.943, 1971.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram

positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, Baltimore, v.40, p.722-756, 1976.

TAGG, J.R. Bacteriol BLIS. **ASM News**, AnnArbor, v.57, p.611, 1991.

TANNOCK, G.W.; SAVAGE, D.C. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 9, p. 591-598, 1974.

TANNOCK, G.W. Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body. London: Chapman & Hall, 1995, p.1-5.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.8, p.527-533, 1998.

TANNOCK, G.W. A fresh look at the intestinal microflora. In: \TANNOCK. G.W. (Ed.). **Probiotics a critical review**. Wyomondham: Horizon Scientific Press, 1999. p.5-14, 1999.

TOOD, E.C.D. Epidemiology of the foodborne diseases: a world wide review. **World health Stat. Q.**, Geneve, v.50, p.30-50, 1997.

TORTUERO, F. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. **Poult. Sci.**, Champaign, v.52, p.197-203, 1973.

TRAVI ALIMENTOS. **Probióticos** – Porto Alegre, 2002. Disponível em: <[http:// www.travialimentos.com.br/probioticos.htm](http://www.travialimentos.com.br/probioticos.htm)>. Acesso em 10 set. 2002.

TOBA, T.; YOSHIOKA, E.; ITOH, T. Acidophilucin A, a new heat labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.12, p.106-108, 1991.

ZAJDEL, J.K.; GEGLOWSKI, P.; DOBRZANSKI, W.T. Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremosis* 202. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.49, n.4, p.969-974, 1985.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis** . New Jersey: Prentice Hall, 1996. p.718.

WIJTZES, T.; BRUGGEMAN, M.J.R.; NOUT, M.H.; ZWIETERING. Acomputeresed system for the identification of Lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.38, p.65-70, 1997.

WILKINSON, B.J., JONES, D.A. A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, Colcherter, v.98, p.399-421, 1977.

ABSTRACT

Native intestinal lactic acid bacteria from poultry and mammals provide an adverse environment to development of pathogenic microorganisms. Recently, beyond its use as probiotics, the application in food conservation has been researched. Species like *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostocs* are used in fermented food, presenting antagonistic properties to same species and/or pathogenic bacterias. *Lactobacillus* spp. species used in probiotics and competitive exclusion products have benefic effects due direct action on particular groups of pathogenic microorganisms. Just by these advantages, lactic acid bacteria have been exhaustively studied allowing the detection of antibiose promoters substances as organic acids, bacteriophags, hydrogen peroxide, and bacteriocins. In the present study, 474 lactic acid bacteria from *Lactobacillus* species were isolated from the crop and ceca of chicken. Two hundred sixty five samples presented inhibitory activity against indicator microorganisms (Gram-positive and Gram-negative bacterias) using the spot-on-the-lawn assay. Fifty three samples identified as *Lactobacillus reuteri*, *L. salivary* and *L. spp.* confirmed inhibition of *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. but not on *Lactobacillus casei*, *L. delbrureckii*, *L. fermentum* and *L. helveticus* by bacteriocins action by antagonistic the simultaneons methods of well diffusion assay on anaerobiosis. The antagonism was detected by inhibition zones to various indicators microorganisms.