

ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA

ESTUDO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Lactobacillus*  
*delbrueckii* UFV H2b20 SUBMETIDO A CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F383e  
2006

Ferreira, Alessandra Barbosa, 1980-  
Estudo da resistência a antimicrobianos em  
*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 submetido  
a condições de estresse / Alessandra Barbosa Ferreira.  
– Viçosa : UFV, 2006.  
xi, 53f. : il. ; 29cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-53.

1. Lactobacilo - Efeito do stress. 2. Drogas - Resis-  
tência em microorganismos. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.37

ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA

ESTUDO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Lactobacillus*  
*delbrueckii* UFV H2b20 SUBMETIDO A CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 22 DE FEVEREIRO DE 2006

---

Profª Maria Aparecida Scatamburlo Moreira  
(Conselheira)

---

Virgínia Maria Chaves Alves  
(Conselheira)

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges

---

Prof. Nélio José de Andrade

---

Profª Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

Aos meus pais, Alexandre e Márcia  
Aos meus irmãos, Flávio e Márcio

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade para a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação segura, pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho.

Às minhas conselheiras, a professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e a doutora Virgínia Maria Chaves Alves, pelos conselhos e sugestões valiosas.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges pelos conselhos e pelo incentivo.

Ao professor Nélio José de Andrade pelas sugestões.

Ao professor Maurício Dutra pelo auxílio importante na análise estatística.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pela competência na execução de seus trabalhos.

À minha estagiária, Aline e ao estudante de iniciação científica Marcelo, pela ajuda, pela seriedade e responsabilidade na execução do trabalho.

A Nilcéia, Laura e Aparecida pela ajuda.

Aos funcionários Danilo, Evandro, Sr. Toninho e Sr. Paulo pela colaboração.

Aos colegas e amigos do laboratório de Microbiologia Industrial, José Carlos, Thiago, Néia, Inês, Gustavo, Fernanda, Danielle, Ana Paula, Carla, Marta, Eliana, Tiago e Murilo.

Às amigas Patrícia e Cida, que me ensinaram os primeiros passos no laboratório de Microbiologia.

Ao amigo Thiago pela boa vontade e disposição em me ajudar.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Genética, Anaeróbio, Petróleo e Micorriza.

Ao funcionário João Paulo e ao professor Everaldo, do laboratório de Proteína do Departamento de Bioquímica, pela disponibilização do aparelho Leitor de ELISA e pela ajuda durante o período de experimentos.

Aos meus irmãos Flávio e Márcio, pelo exemplo, companheirismo e amizade.

Em especial, agradeço aos meus pais, Alexandre e Márcia, meus grandes incentivadores, por todo o carinho, amor, dedicação, apoio, companhia e confiança.

## **BIOGRAFIA**

ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA, filha de Alexandre da Silva Ferreira e Márcia Maria Barbosa Ferreira, nasceu no dia vinte e sete de outubro de 1980 em Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais.

Em março de 1999, ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Nutricionista em Janeiro de 2004.

Em março de 2004, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

## CONTEÚDO

|  |      |
|--|------|
| RESUMO .....   | viii |
| ABSTRACT .....   | x    |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....   | 3    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS  |      |
| 3.1. Microrganismo .....   | 11   |
| 3.2. Padronização da cultura .....   | 12   |
| 3.3. Efeito de peróxido de hidrogênio no crescimento de <i>L. delbrueckii</i><br>UFV H2b20 .....                       | 12   |
| 3.4. Resistência a antimicrobianos em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....  | 13   |
| 3.5. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a antimicrobianos<br>em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 ..... | 15   |
| 3.6. Análise Estatística .....   | 18   |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 19   |
| 4.1. Efeito de peróxido de hidrogênio no crescimento de <i>L. delbrueckii</i><br>UFV H2b20 .....                       | 19   |
| 4.2. Resistência a antimicrobianos em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....  | 22   |
| 4.3. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a antimicrobianos<br>em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 ..... | 28   |



|  |    |
|--|----|
| 4.3.1 Efeito de condições de estresse sobre a resistência a aminoglicosídeos em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....        | 28 |
| 4.3.2. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a nitrofuranos em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....           | 36 |
| 4.3.3. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a $\beta$ -lactâmicos em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....    | 38 |
| 4.3.4. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a outros antimicrobianos em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 ..... | 41 |
| 5. CONCLUSÕES .....  | 45 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 47 |

## RESUMO

FERREIRA, Alessandra Barbosa, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Estudo da resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 submetido a condições de estresse.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiras: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Virgínia Maria Chaves Alves.

A resistência a antimicrobianos e o efeito de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foram estudados. Os efeitos de choque térmico, choque ácido, exposição a sais biliares e presença de peróxido de hidrogênio sobre a resistência a antimicrobianos nesta bactéria também foram investigados. A determinação do modelo de resistência, pelo método de difusão em meio sólido, indicou que *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresenta resistência a vancomicina, a alguns  $\beta$ -lactâmicos, a sulfametoxol, a aminoglicosídeos, a nitrofuranos, a quinolonas e a colistina e susceptibilidade moderada a cloranfenicol, a tetraciclina, a cefalotina, a ampicilina e a eritromicina. *L. delbrueckii* UFV H2b20 é capaz de crescer em altas concentrações de peróxido de hidrogênio e inibição completa do crescimento só foi observada com 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$

<sup>1</sup>. Os efeitos de condições de estresse sobre a resistência a antimicrobianos foram determinados pela comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada pelo método de microdiluição em meio líquido, de células submetidas e de não submetidas às condições de estresse citadas. O choque térmico provocou efeitos diversos sobre a resistência a aminoglicosídeos e a  $\beta$ -lactâmicos, diminuiu a resistência a nitrofuranos e a tetraciclina e não alterou a resistência a cloranfenicol e a espiramicina. O choque ácido também provocou efeitos diferentes sobre a resistência a aminoglicosídeos e a  $\beta$ -lactâmicos, diminuiu a resistência a nitrofuranos e a tetraciclina, não alterou a CIM de cloranfenicol e aumentou a resistência a espiramicina. A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares provocou diminuição da CIM de quase todos os antimicrobianos testados, exceto furazolidona, sulfametoxol e ácido nalidíxico, que não tiveram a resistência alterada até a concentração máxima testada. A presença de peróxido de hidrógeno provocou efeitos diferentes sobre a resistência a aminoglicosídeos, diminuiu a resistência a nitrofuranos, a  $\beta$ -lactâmicos, a tetraciclina e a espiramicina e aumentou a resistência a cloranfenicol. Os resultados demonstram ampla diversidade nas respostas ao choque térmico, ao choque ácido e ao peróxido de hidrogênio e similaridade na resposta à exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares.

## ABSTRACT

FERREIRA, Alessandra Barbosa, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Effect of stress on antimicrobial resistance in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee members: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira and Virgínia Maria Chaves Alves.

The effects of heat shock, acid treatment, exposure to bile salts and the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on antimicrobial resistance in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 were determined. Agar diffusion assays results indicated that this bacterium is resistant to vancomycin, sulphamethoxazole, colistin, some β-lactams, aminoglycosides, nitrofurans and quinolones. It is moderately susceptible to chloramphenicol, tetracycline, cephalothin, ampicillin and erythromycin. *L. delbrueckii* UFV H2b20 can grow on high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and complete inhibition will be observed only at 70 μg mL<sup>-1</sup>. Different effects on the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the antimicrobials were observed when the bacterial cells were exposed to several stress conditions. Heat shock affected resistance to different aminoglycosides and β-lactams in various ways; it

diminished resistance to nitrofurans and to tetracycline; however, it had no effect over resistance to chloramphenicol and espiramycin. The same results were observed for acid pre-treatment at pH 3,5 for 30 min, except that it resulted in enhancement of espiramycin resistance. Cell exposure to 0,5% bile salts resulted in diminished MICs for almost all tested antibiotics, except, apparently, furazolidone, sulphametoxol and nalidix acid, which maintained resistance to the highest concentrations tested. The presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 µg mL<sup>-1</sup>, had various effects on aminoglycosides, diminished resistance to nitrofurans, β-lactams, tetracycline and espiramycin; however, it enhanced resistance to chloramphenicol. These results demonstrate an ample diversity of responses to heat shock, acid shock, presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and also a general response when cells of *L. delbrueckii* UFV H2b20 are exposed to bile sal

## 1. INTRODUÇÃO

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, objeto de vários estudos conduzidos pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, apresenta características funcionais que o qualificam como microrganismo potencialmente probiótico, além de possuir características importantes para sua produção industrial.

Nos últimos anos, a questão da resistência a antimicrobianos em probióticos tem sido objeto da atenção de pesquisadores em razão da possível transferência de genes de resistência para bactérias comensais e para as potencialmente patogênicas presentes no trato gastrintestinal. Por isso, microrganismos que possuem genes de resistência transferíveis não devem ser utilizados como probióticos para humanos e animais.

Por outro lado, o conhecimento do padrão de resistência a antimicrobianos faz-se necessário quando probióticos são administrados associados à terapia antibiótica, para verificar a capacidade de sobrevivência dos mesmos no intestino durante o tratamento com antibióticos. A administração de antimicrobianos provoca alterações na microbiota intestinal normal, por permitir o crescimento

excessivo de linhagens patogênicas no trato gastrointestinal e a seleção de bactérias resistentes. Contudo, a suplementação probiótica em pacientes sob terapia antibiótica pode contribuir para a manutenção e o restabelecimento da microbiota intestinal. Nesses casos, a resistência por mecanismos intrínsecos, com menor probabilidade de transferência, representa característica importante e desejável.

Os microrganismos probióticos são submetidos a várias condições de estresse, durante as etapas de processamento industrial e a passagem pelo trato gastrointestinal, que podem alterar a fisiologia e as características intrínsecas da célula bacteriana. Alguns estudos têm indicado que linhagens de *Lactobacillus*, resistentes intrinsecamente a aminoglicosídeos, tornaram-se sensíveis a esses antimicrobianos na presença de sais biliares em concentração semelhante à do trato gastrointestinal.

Este estudo teve por objetivo determinar o perfil de resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20, bem como investigar o efeito de condições prevalentes do trato gastrointestinal e do processamento industrial sobre esta resistência.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias do ácido láctico são caracterizadas como cocos ou bastonetes, Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase negativos e, que crescem sob condições que variam de microaerofílicas a estritamente anaeróbias (KLEIN et al., 1998). Representam um grupo de bactérias que são funcionalmente relacionadas pela capacidade de produzirem ácido láctico durante o metabolismo homo ou heterofermentativo (KLAENHAMMER et al., 2002).

As bactérias do ácido láctico têm sido utilizadas há muito tempo na produção de alimentos fermentados por conferirem características organolépticas desejáveis e atuarem na preservação desses produtos. Além disso, algumas, principalmente *Lactobacillus*, são consideradas probióticos por exercerem efeitos benéficos ao hospedeiro e por ocuparem nichos importantes no trato gastrintestinal de humanos e animais (KLAENHAMMER et al., 2002).

Probióticos podem ser conceituados como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos fisiológicos no hospedeiro (REID et al., 2003). Dentre os mecanismos potenciais para ação dos probióticos podem ser destacados: manutenção da resistência da mucosa intestinal



a doenças infecciosas (GAGNON et al., 2004); redução do colesterol (LIONG e SHAH, 2005); produção de metabólitos antimicrobianos (FENTEN et al., 1999); imunomodulação (MARAGKOUDAKIS et al., 2006) e imunoestimulação (NEUMANN et al., 1998).

Alguns critérios de seleção para microrganismos potencialmente probióticos têm sido utilizados, como estabilidade fenotípica e genotípica; tolerância e crescimento em condições ácidas e na presença de sais biliares; propriedades de adesão ao epitélio intestinal; produção de substâncias antimicrobianas; atividade antagonista contra patógenos intestinais e padrões de resistência a antimicrobianos (TUOMOLA et al., 2001; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Dentre esses critérios, o padrão de resistência a antimicrobianos pode ser destacado (SAARELA et al., 2000; COEURET et al., 2004). A determinação da susceptibilidade a antimicrobianos é importante para verificar se os microrganismos carregam genes de resistência transferíveis (MATHUR e SINGH, 2005), já que essas bactérias não devem ser utilizadas como probióticos para humanos e animais (SAARELA et al., 2000; COEURET et al., 2004), devido à possibilidade de transferência de tais genes para bactérias comensais e para as potencialmente patogênicas presentes no trato gastrintestinal (MATHUR e SINGH, 2005). Porém, teste de resistência fenotípica é útil para triagem e detecção de determinantes de resistência a antibióticos, mas não é capaz de distinguir resistência intrínseca da adquirida (KASTNER et al., 2006).

Os principais mecanismos de resistência a antimicrobianos são: modificação enzimática do antimicrobiano, efluxo ativo das moléculas e modificação de seu alvo celular (WALSH, 2003).

As bactérias do ácido láctico exibem naturalmente uma ampla variação de resistência e susceptibilidade a antimicrobianos (CHARTERIS et al., 1998). Na maioria dos casos, a resistência em bactérias do ácido láctico não é do tipo transmissível, mas representa uma característica intrínseca da espécie ou do gênero (SALMINEN et al., 1998). Resistência intrínseca é aquela que resulta na capacidade do organismo de crescer na presença de um agente antimicrobiano, em razão de característica inerente ao organismo. A resistência adquirida pode ser

transferida horizontalmente entre bactérias e resulta de mutações no genoma bacteriano ou da aquisição de genes de resistência através dos processos de conjugação, transdução e transformação (MATHUR e SINGH, 2005).

A susceptibilidade a antimicrobianos em microrganismos intestinais é critério importante para seleção de linhagens probióticas (MOOUBARECK et al., 2005). Além da questão da transferência de genes de resistência de bactérias probióticas para as patogênicas, linhagens que mostram resistência intrínseca a antibióticos específicos podem ser ministradas juntamente com os antibióticos (CEBECI E GÜRAKAN, 2003), podendo beneficiar pacientes cuja microbiota intestinal normal encontra-se desbalanceada ou reduzida, em razão da administração de agentes antimicrobianos (ZHOU et al., 2005). Nesses casos, o uso de antimicrobiano associado com uma linhagem probiótica, resistente intrinsecamente a esse antimicrobiano, pode oferecer resultados significativamente melhores (CEBECI E GÜRAKAN, 2003).

A microbiota intestinal desempenha algumas funções fisiológicas importantes no hospedeiro, como: estimulação do sistema imune, manutenção da circulação e nutrição da mucosa, síntese de nutrientes (HOLZAPFEL et al., 1998) e inibição do crescimento excessivo e da colonização gastrintestinal por bactérias potencialmente patogênicas (HOOKER e DIPIRO, 1988). Essa microbiota pode ser afetada pela terapia antibiótica (SULLIVAN et al., 2001; ARICI et al., 2004). A extensão desse distúrbio depende de vários fatores como espectro de ação do antimicrobiano, absorção, dose, duração e rota de administração, degradação enzimática potencial e concentração ativa do antimicrobiano no intestino (LEVY, 2000).

Bactérias probióticas podem ser usadas para restaurar ou otimizar o balanço microbiano intestinal e promover saúde (GILL, 2003), prevenindo e amenizando desordens causadas pela administração de antimicrobianos (MADDEN et al., 2005). A suplementação diária com bactérias probióticas viáveis durante e após a terapia antibiótica reduz as alterações na microbiota intestinal, bem como, a incidência e o número total de linhagens resistentes a antibióticos na

população (PLUMMER et al., 2005) e acelera o restabelecimento da população microbiana (MADDEN et al., 2005).

*Lactobacillus* UFV H2b20, isolado e caracterizado por SANTOS (1984), apresenta resistência a condições semelhantes às do trato gastrointestinal, como altas concentrações de sais biliares, ácido clorídrico e presença de lisozima (AGOSTINHO, 1988). Esta bactéria produz peróxido de hidrogênio em concentrações suficientes para inibir grupos diversos de microrganismos (RIBEIRO, 1995). Além dessas características, *Lactobacillus* UFV H2b20 mostrou-se capaz de colonizar o trato gastrointestinal e de estimular a resposta imune não específica em camundongos livres de germe (NEUMANN et al., 1998). Com o estudo filogenético desta bactéria, foi possível agrupá-la entre as subespécies de *Lactobacillus delbrueckii*, passando a ser nomeada de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (NEVES, 1998; UETANABARO, 1999; NEVES, 2003; FLORESTA, 2003).

Microrganismos utilizados como probióticos são expostos a vários estresses ambientais como temperaturas altas, pH baixo, presença de sais biliares e formas reativas de oxigênio, que podem afetar o estado fisiológico e as propriedades da célula (ANGELIS e GOBBETTI, 2004). O aumento da viabilidade celular pode ser alcançado após exposição a estresses subletais, como ácido, oxigênio ou temperatura elevada, que desencadeiam respostas adaptativas aos estresses, aumentando a sobrevivência em condições letais encontradas durante o processamento industrial e a passagem pelo trato gastrointestinal (STANTON et al., 2005).

O principal efeito induzido pela temperatura alta é a desnaturação de proteínas e suas subseqüentes agregações, desestabilização de estruturas como ribossomo e macromoléculas como RNA e DNA e alteração da fluidez da membrana (VAN DE GUCHTE et al., 2002). Quando as células são expostas ao choque térmico ocorre aumento da síntese de algumas proteínas que promovem o correto dobramento de polipeptídeos nascentes, montagem de complexos de proteínas e degradação de proteínas (ANGELIS e GOBBETTI, 2004).

Estudos fisiológicos têm demonstrado que as bactérias do ácido láctico respondem ao choque térmico de forma similar a outras bactérias Gram-positivas. Os dois principais grupos de proteínas do choque térmico consistem das famílias de 70 KDa (DnaK) e 60 KDa (GroEL) que funcionam como chaperones. Os componentes de DnaK consistem, tipicamente, de DnaK, DnaJ e GrpE, enquanto que GroEL é composta de GroEL e GroES (ANGELIS e GOBBETTI, 2004). Essas proteínas ou os genes que as codificam já foram identificados em várias bactérias do ácido láctico (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

Em *L. delbrueckii* UFV H2b20, o choque térmico de 50°C por 30 minutos, promoveu termotolerância, conferindo tanto resistência a tratamentos térmicos quanto aumentando a faixa de temperatura para crescimento desta bactéria. Observou-se também que os padrões eletroforéticos de proteínas das células cultivadas a 37°C e a 50°C foram distintos e, quando as células retornaram a 37°C, por 40 minutos, após o choque térmico, os padrões foram mais semelhantes ao controle, confirmando que esse choque provoca modificações transitórias na célula (MONTEIRO, 1999). Esse pré-tratamento aumenta a resistência das células quando submetidas à desidratação (FURTADO, 2001).

Linhagens probióticas de *Lactobacillus* são expostas ao estresse ácido extremo quando alcançam o estômago, em razão da presença de ácido clorídrico (ANGELIS e GOBBETTI, 2004). Os efeitos do estresse ácido na fisiologia bacteriana não são conhecidos em detalhes. Está bem estabelecido, entretanto, que ácidos não dissociados podem difundir passivamente através da membrana celular e, após atingirem o citoplasma, rapidamente dissociam-se em prótons e derivados carregados, aos quais a célula é impermeável. O acúmulo intracelular de prótons pode diminuir o pH intracelular (pHi) e assim afetar o  $\Delta$ pH transmembrana que contribui para a força próton-motora e é usada como uma fonte de energia em numerosos processos de transporte. A acidificação interna também reduz a atividade de enzimas sensíveis ao ácido e danifica proteínas e DNA (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

As bactérias do ácido láctico possuem alguns mecanismos para manter a homeostase celular em ambiente com pH baixo. A expulsão de prótons para fora

da célula através da enzima multimérica ATPase, a via arginina desaminase e a descarboxilação de aminoácidos constituem mecanismos que provocam aumento da alcalinidade do citoplasma e já foram identificados em algumas espécies de *Lactobacillus* (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 apresenta resistência a pH 2,5 por duas horas e meia quando submetido, previamente, ao choque ácido (pH 3,5/30 minutos) (MONTEIRO, 1999). Esse pré-tratamento também aumenta a resistência das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, quando submetidas à desidratação (FURTADO, 2001).

Bile é uma secreção digestiva que possui papel principal na emulsificação e na solubilização de lipídeos e tem a capacidade de afetar fosfolipídeos e proteínas da membrana, alterando a homeostase celular. Conseqüentemente, a capacidade de tolerar a bile é importante para sobrevivência das bactérias probióticas e subsequente colonização no trato gastrintestinal (BEGLEY et al., 2005).

A genética da resistência à bile é pouco entendida, particularmente em bactérias Gram-positivas. A capacidade de um microrganismo de tolerar a bile requer um grande conjunto de proteínas, envolvidas na arquitetura do envelope celular e na manutenção da homeostase intracelular (BEGLEY et al., 2005).

A extrusão da bile, como mecanismo de resistência a sais biliares, já foi caracterizada em bactérias Gram-negativas. Esse mecanismo é mediado por sistemas de efluxo pertencentes à família de transportadores de resistência multidroga, responsáveis pela resistência a numerosos compostos tóxicos, incluindo antibióticos, solventes orgânicos, detergentes e sais biliares (VAN DE GUCHTE et al., 2002). Esses sistemas estão amplamente distribuídos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PUTMAN et al., 2000), entretanto, o papel na resistência a bile não foi determinado em bactérias Gram-positivas (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

Vários microrganismos da microbiota intestinal, incluindo algumas bactérias do ácido láctico, podem metabolizar sais biliares. Em *Lactobacillus*, as hidrolases desconjugam sais biliares, hidrolisando os aminoácidos glicina ou taurina. Essa hidrólise altera as propriedades da bile, diminuindo a solubilidade e a

atividade detergente, contribuindo para a proteção celular contra os efeitos dos sais biliares (BEGLEY et al., 2005). Entretanto, a atividade dessas enzimas e a resistência a sais biliares são propriedades que não estão relacionadas em *Lactobacillus* (MOSER e SAVAGE, 2001).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 tolera concentrações elevadas de sais biliares (SANTOS, 1984; AGOSTINHO, 1988). O crescimento das células expostas por 2 horas a 1,0% de sais biliares sofre redução de apenas um ciclo logarítmico e após 24 horas de exposição, de dois ciclos logarítmicos (AGOSTINHO, 1988).

Estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio são geradas em altas concentrações, por compostos químicos exógenos ou por processos metabólicos endógenos no alimento ou no corpo humano (WANG et al., 2006), resultando em dano a DNA, a proteínas e a lipídeos (KULLISAAR et al., 2002).

Diferentes mecanismos de resistência ao estresse oxidativo têm sido descrito em bactérias do ácido láctico. Dentre esses mecanismos, prevenção da formação e eliminação de espécies reativas do oxigênio e reparo do dano oxidativo podem ser destacados (VAN DE GUCHTE et al., 2002). *L. delbrueckii ssp bulgaricus* elimina o oxigênio através da reação catalizada por uma NADH oxidase (MARTY-TEYSSET et al., 2000). Essa reação produz peróxido de hidrogênio que é tóxico para a célula e como essa bactéria não possui catalase, a presença desse composto causa atraso no crescimento. Entretanto, algumas espécies de *Lactobacillus* possuem NADH peroxidase, que consome o peróxido de hidrogênio e previne a morte celular (TALWALKAR e KAILASAPATHY, 2003). Poucas linhagens de *Lactobacillus* produzem pseudocatalase (sem grupo heme) que degrada o peróxido de hidrogênio (KANDLER e WEISS, 1986). O reparo do dano oxidativo é o último mecanismo de resistência contra esse estresse. Em *Lactococcus lactis*, o produto do gene *recA*, pode aliviar o estresse oxidativo reparando danos causados ao DNA (RALLU et al., 2000).

Condições ambientais podem alterar a resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus* (ELKINS e MULLIS, 2004). *Lactobacillus crispatus* CHCC3692, resistente a eritromicina, tornou-se sensível ao antimicrobiano quando submetido

ao choque térmico. Esse tratamento aumentou a transcrição do gene de uma transposase, aumentando assim a frequência de perda do elemento transponível que codifica resistência a eritromicina (STRØMAN et al., 2003).

Diminuição da resistência a aminoglicosídeos, em linhagens de *Lactobacillus* expostas a 0,5% de sais biliares, foi descrita por CHARTERIS et al (2000) e ELKINS e MULLIS (2004). Além disso, algumas linhagens de *Lactobacillus* também apresentaram diminuição da resistência a polimixina B, a tetraciclina, a cloranfenicol, a eritromicina, a rifampicina, a ampicilina e a penicilina, quando submetidas a essa mesma condição (CHARTERIS et al., 2000).

O desenvolvimento de probióticos biologicamente efetivos e tecnologicamente factíveis depende do conhecimento de todas as suas características que possam ser alteradas durante o processamento e o seu trajeto no organismo humano. O efeito das condições ambientais prevaletentes no trato gastrointestinal sobre a resistência a antimicrobianos representa um dos desafios atuais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3.1. Microrganismo**

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolado e caracterizado por SANTOS (1984). Culturas estoque foram produzidas após crescimento, a 37°C, em caldo MRS contendo 2% de glicose e centrifugação a aproximadamente 7000g, a 4°C, por 10 minutos, em centrífuga Sorvall RT 6000B. As células foram ressuspendidas em caldo MRS com 20% de glicerol. Alíquotas de 1 mL foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.



### **3.2. Padronização da cultura**

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservadas a -80°C foram reativadas em leite desnatado reconstituído em água para concentração final de 10% (p/v) e repicadas duas vezes em meio MRS contendo 2% de glicose. Após a segunda repicagem, elas foram cultivadas por 12 horas e, em seguida, coletadas por centrifugação a aproximadamente 7000g, a 4°C, por 10 minutos, em centrífuga Sorvall RT 6000B. A massa celular ressuspensa em caldo MRS foi padronizada a uma densidade óptica de 0,6 em espectrofotômetro Spectronic 20D, em comprimento de onda de 600nm (MONTEIRO, 1999).

### **3.3. Efeito de peróxido de hidrogênio no crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20**

A solução de peróxido de hidrogênio (Sigma - St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 1600 µg mL<sup>-1</sup>. O reagente foi diluído em meio MRS contendo 2% de glicose e essa solução foi filtrada em membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 µm de diâmetro (Schleicher e Schuell, Alemanha) com pH previamente ajustado com NaOH 5M para 6,8, conforme RIBEIRO (1995).

Cultura padronizada de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi diluída em solução salina 0,85% (p/v) para 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 150 µL da cultura diluída foram adicionados nos orifícios da placa de microdiluição (Nunc-Immuno™ plates), esterilizadas por radiação ultravioleta e previamente preenchidas com 150 µL da solução de peróxido de hidrogênio, totalizando 300 µL por orifício da placa. Dessa maneira, as concentrações finais de peróxido de hidrogênio nos orifícios da placa corresponderam a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg mL<sup>-1</sup>. As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C, em ambiente microaerofílico. Esse procedimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes, fazendo-se os controles necessários.

A curva de crescimento foi construída em função das médias aritméticas das leituras de densidade óptica, obtidas em intervalos de tempo preestabelecidos,

em aparelho leitor de ELISA (Titertek multiskan, Plus-MkII) com filtro de 560nm. Os resultados foram apresentados como D.O.<sub>560nm</sub> em função do tempo.

A partir da curva de crescimento, a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) foi determinada pela regressão linear dos valores obtidos do logaritmo neperiano da D.O.<sub>560nm</sub> na fase exponencial de crescimento em função do tempo. A  $\mu_{\max}$  é o coeficiente angular da relação D.O.<sub>560nm</sub> versus tempo, dada pela equação da regressão linear.

### **3.4. Resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

#### **3.4.1. Determinação do perfil de resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

O perfil de resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi determinado a partir do antibiograma. Para isso, os discos de papel-filtro contendo concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) específicas dos seguintes antimicrobianos foram utilizados: vancomicina (30), cloranfenicol (30), cefoxitina (30), cefotaxima (30), cefalexina (30), cefalotina (30), ampicilina (10), penicilina G (10 U.I.), sulfametoxol-trimetropim (25), sulfazotrim (25), amicacina (30), neomicina (10), gentamicina (10), tetraciclina (30), rifampicina (5), furazolidona (15), perfloxacina (5), ácido nalidíxico (30), eritromicina (15) (Cecon, Brasil); espiramicina (100), cefaclor (30), espectinomicina (10), nitrofurantoína (50), colistina (10) (Oxoid, U.K.); estreptomicina (10) (Laborclin, Brasil).

Cultura padronizada de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi espalhada, uniformemente, com um “swab” estéril sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar MRS. Discos de papel-filtro contendo os antimicrobianos, em triplicata, foram colocados sobre a superfície do ágar MRS em posições equidistantes. Após 24 horas de incubação a 37°C, em ambiente microaerofílico, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e a média das triplicatas foi calculada (ELKINS e MULLIS, 2004).

O perfil de resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Quadro 1) foi interpretado conforme limites de medidas de halos, definidos em

CHARTERIS et al (1998). Este critério foi adotado já que não existe ponto de corte padrão, para determinação da resistência a antimicrobianos, destinado especificamente a *Lactobacillus*. O resultado foi expresso em termos de resistência (R), susceptibilidade moderada (SM) ou susceptibilidade (S), conforme CHARTERIS et al (1998).

### **3.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A CIM foi determinada utilizando-se o método de microdiluição em meio líquido (NCCLS, 2004), com algumas modificações. A partir do resultado do antibiograma, foram selecionados dezesseis antimicrobianos (Sigma - St. Louis, MO, EUA) utilizados na terapêutica humana para determinação da CIM: ácido nalidíxico, ampicilina, canamicina, cefadroxil, cefalexina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, espectinomicina, espiramicina, furazolidona, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína, sulfametoxol e tetraciclina.

Os antimicrobianos ampicilina, canamicina, cefadroxil, cefalexina, eritromicina, estreptomicina, espectinomicina, espiramicina, gentamicina, neomicina e tetraciclina foram dissolvidos em água deionizada. O ácido nalidíxico foi dissolvido em água com pH ajustado com NaOH 5M para 12,12. Em acetona foram dissolvidos furazolidona (71,4%) e nitrofurantoína (43%). Sulfametoxol e cloranfenicol foram dissolvidos em metanol e etanol, respectivamente (THE MERCK INDEX, 1996; SAMBROCK et al.,1998). Em seguida, as soluções foram filtradas em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 µm de diâmetro (Schleicher e Schuell, Alemanha). Alíquotas de 500 µL foram mantidas a -20°C.

Cultura padronizada de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi diluída em solução salina 0,85% (p/v) para  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 150 µL da cultura diluída foram colocados em orifícios da placa de microdiluição (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> plates), esterilizadas por radiação ultravioleta e previamente preenchidos com 150 µL da solução de antimicrobiano em concentração dupla diluída em meio MRS, totalizando 300 µL por orifício da placa. Dessa maneira, a solução de antimicrobianos nos orifícios da placa correspondeu às concentrações finais

desejadas. As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C, em ambiente microaerofílico. Esse procedimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes, fazendo-se os controles necessários.

As curvas de crescimento foram construídas em função das médias aritméticas das leituras de densidade óptica obtidas em intervalos de tempo preestabelecidos em aparelho leitor de ELISA (Titertek multiskan, Plus-Mk11) com filtro de 560nm. Os resultados foram apresentados como D.O.<sub>560nm</sub> em função do tempo.

A CIM foi estabelecida como a menor concentração do antimicrobiano que impedia o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária do controle (bactéria cultivada em meio MRS sem antimicrobiano), conforme MOREIRA (2005).

### **3.5. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

#### **3.5.1. Efeito do choque térmico sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

Cultura padronizada de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi mantida em banho-maria, à temperatura de 50°C por 30 minutos, conforme MONTEIRO (1999). Após o choque térmico, as células foram coletadas por centrifugação a aproximadamente 7000g, a 4°C, por 10 minutos, em centrífuga Sorvall RT 6000B, ressuspendidas em meio MRS contendo 2% de glicose e padronizadas novamente.

Em seguida, esta cultura foi utilizada para determinação da CIM de células submetidas ao choque térmico, seguindo o procedimento descrito no item 3.4.2. O efeito do choque térmico sobre a resistência a antimicrobianos foi determinado pela comparação entre CIM de células submetidas e de não submetidas ao choque térmico.

### **3.5.2. Efeito de choque ácido sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram padronizadas seguindo procedimento descrito no item 3.2, exceto que a massa celular foi ressuspensa em caldo MRS com pH ajustado com HCl 1M para 3,5.

A cultura padronizada foi mantida por 30 minutos em meio MRS com pH ajustado para 3,5, de acordo com MONTEIRO (1999). Após o choque ácido, as células foram coletadas por centrifugação. O sedimento obtido foi lavado com salina tamponada (pH 7,2). Após lavagem, a massa celular foi ressuspensa em caldo MRS contendo 2% glicose e padronizada novamente.

Em seguida, esta cultura foi utilizada para determinação da CIM de células submetidas ao choque ácido, seguindo o procedimento descrito no item 3.4.2. O efeito do choque ácido sobre a resistência a antimicrobianos foi determinado pela comparação entre CIM de células submetidas e de não submetidas ao choque ácido.

### **3.5.3. Efeito de sais biliares sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram padronizadas seguindo procedimento descrito no item 3.2, exceto que a massa celular foi ressuspensa em caldo MRS contendo 0,5% (p/v) de sais biliares conjugados (Difco, Detroit, Michigan, USA).

A cultura padronizada foi mantida por duas horas em meio MRS contendo 0,5% (p/v) de sais biliares. Transcorrido esse tempo, as células foram coletadas por centrifugação. O sedimento obtido foi lavado com salina tamponada (pH 7,2). Após lavagem, a massa celular foi ressuspensa em caldo MRS contendo 2% glicose e padronizada novamente.

Esta cultura foi utilizada para determinação da CIM de células expostas a sais biliares, seguindo o procedimento descrito no item 3.4.2. O efeito da presença

de sais biliares sobre a resistência a antimicrobianos foi determinado pela comparação entre CIM de células expostas e de não expostas aos sais biliares.

A solução de sais biliares foi preparada na concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>. O reagente em pó foi diluído em água destilada estéril e esta solução foi filtrada em membrana com poro de 0,45 µm de diâmetro (Schleicher e Schuell, Alemanha) e estocada sob refrigeração de 4 a 10°C. Esta solução estoque foi diluída em meio MRS contendo 2% de glicose para alcançar a concentração final de 0,5% (p/v) de sais biliares.

#### **3.5.4. Efeito de peróxido de hidrogênio sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

Para determinar o efeito da presença de peróxido de hidrogênio sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20, cultura padronizada desta bactéria foi diluída em solução salina 0,85% (p/v) para 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 150 µL da cultura diluída foram colocados em orifícios da placa de microdiluição (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> plates), previamente preenchidos com 150 µL da solução de antimicrobiano diluída em meio MRS, adicionado da solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup>, totalizando 300 µL por orifício da placa. Dessa forma, em cada orifício da placa continha o antimicrobiano na concentração final desejada e peróxido de hidrogênio na concentração previamente estabelecida de 20 µg mL<sup>-1</sup>.

O efeito da presença de peróxido de hidrogênio sobre a resistência a antimicrobianos foi determinado pela comparação da CIM de células expostas e de não expostas a peróxido de hidrogênio.

A solução de peróxido de hidrogênio (Sigma - St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 1600 µg mL<sup>-1</sup>. O reagente foi diluído em meio MRS e esta solução foi filtrada em membrana com poro de 0,45 µm de diâmetro (Schleicher e Schuell, Alemanha) com pH previamente ajustado com NaOH 5M para 6,8, conforme RIBEIRO (1995).

### **3.6. Análise Estatística**

O resultado da CIM de cada antimicrobiano, referente às condições ambientais testadas e ao controle, foi confirmado pela análise estatística. Os dados de densidades ópticas do final do período de crescimento bacteriano em meio contendo concentrações crescentes de antimicrobianos foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeito de peróxido de hidrogênio no crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A figura 1A mostra o efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio foi acompanhado pela diminuição da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) (Figura 1B). Células cultivadas em caldo MRS, sem o peróxido de hidrogênio, apresentaram  $\mu_{\max}$  igual a  $0,28 \text{ h}^{-1}$ . As células crescidas na presença de 5, 10, 20, 30 e  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  as velocidades específicas máximas de crescimento foram 0,24; 0,24; 0,2; 0,14 e  $0,11 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

Em estudo similar, a taxa de crescimento de *Lactobacillus sake* foi menor em células crescidas em caldo MRS adicionado de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, comparado ao controle (sem adição de peróxido de hidrogênio) e a bactéria não cresceu nas concentrações de 16 e  $24 \mu\text{g mL}^{-1}$  (AMANATIDOU et al., 2001).



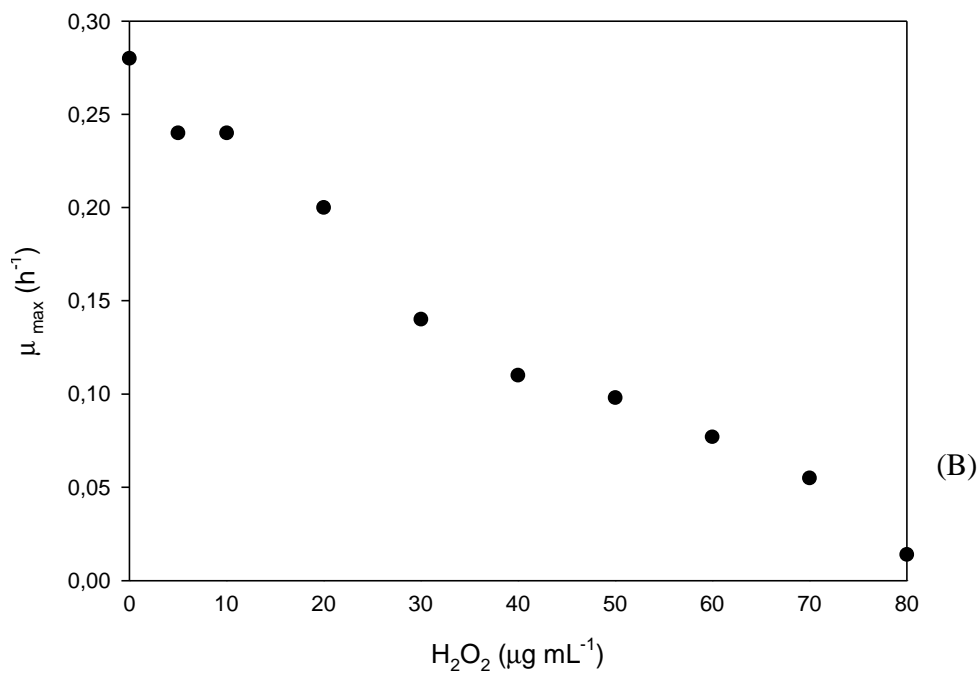
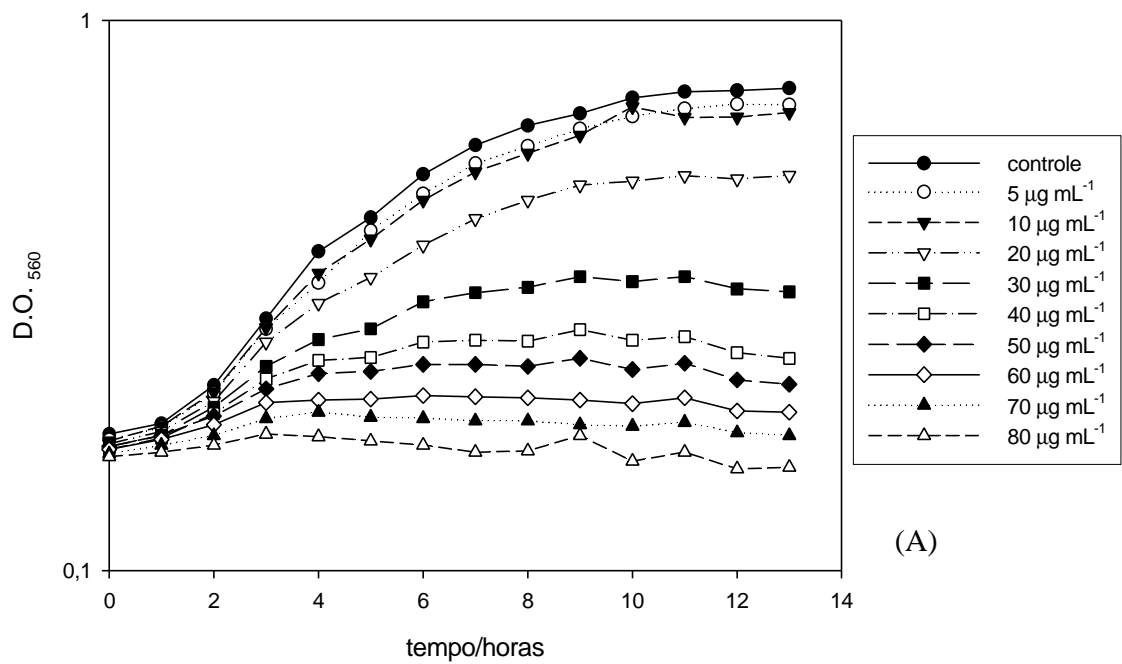


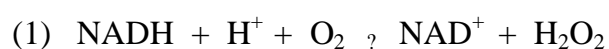
Figura 1 – Efeito do peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram cultivadas em caldo MRS, acrescido de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, em condição microaerófila a 37°C. (A) Crescimento celular foi acompanhado pela medida de densidade óptica a 560nm (D.O.<sub>560</sub>). (B) Efeito de diferentes concentrações de peróxido e hidrogênio sobre a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ).

A capacidade de enfrentar o estresse oxidativo varia entre diferentes grupos de *Lactobacillus*, dependendo do nível e tipos de mecanismos antioxidativos (ANGELIS e GOBBETTI, 2004). O peróxido de hidrogênio teve um efeito menor sobre o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20, quando comparado ao *Lactobacillus sake*, já que 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio não impediram o crescimento desta bactéria, apenas diminuíram em 29% a velocidade específica máxima de crescimento. Crescimento distinto,  $\mu_{\text{max}} = 0,11\text{h}^{-1}$ , foi observado até com 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e inibição completa só foi observada com 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Peróxido de hidrogênio é um oxidante fraco em relação ao radical hidroxil, mas facilmente difusível e apresenta vida média longa. Devido a estas duas últimas características, ele contribui para o dano oxidativo, de forma direta ou como precursor de radicais hidroxil (Imlay et al., 1988 citado por AMANATIDOU et al., 2001), que pode causar danos a DNA, proteínas e lipídeos (AMANATIDOU et al., 2001). Além disso, peróxido de hidrogênio pode promover oxidação de grupos sulfidril, desnaturando enzimas, e pode também provocar a peroxidação de lipídeos, aumentando a permeabilidade da membrana (KONG e DAVISON, 1980).

*Lactobacillus* não possui catalase, uma enzima chave para a degradação de peróxido de hidrogênio. Mas, muitas bactérias desse gênero sintetizam NADH peroxidase, uma enzima importante para a detoxificação de peróxido de hidrogênio, e NADH oxidase que consome o oxigênio do ambiente (CONDON, 1987).

Em bactérias probióticas, a atividade de NADH oxidase resulta na produção de peróxido de hidrogênio, enquanto NADH peroxidase consome o peróxido de hidrogênio, prevenindo a morte celular (TALWALKAR e KAILASAPATHY, 2003). As reações catalisadas por NADH oxidase (1) e NADH peroxidase (2) são respectivamente:



*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produziu peróxido de hidrogênio em reação catalisada por uma NADH oxidase, provavelmente, para eliminar o oxigênio presente. Contudo, essa detoxificação do oxigênio levou a superprodução de peróxido de hidrogênio, composto conhecido por induzir a entrada das células na fase estacionária (MARTY-TEYSSET et al., 2000). A atividade de NADH peroxidase em linhagens de *Lactobacillus* correlaciona-se com taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, uma indicação da importância dessa enzima para a proteção das células dos efeitos letais do acúmulo intracelular de peróxido de hidrogênio (TALWALKAR e KAILASAPATHY, 2003).

Como em outras bactérias do ácido láctico, a capacidade do *L. delbrueckii* UFV H2b20 de produzir peróxido de hidrogênio (RIBEIRO, 1995) e de crescer em altas concentrações desse composto pode estar relacionada à capacidade de síntese de NADH oxidase e de NADH peroxidase.

#### **4.2. Resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

*L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou resistência a vancomicina (Quadro 1). Bactérias do gênero *Lactobacillus* também foram resistentes ao glicopeptídeo (TEMMERMAN et al., 2003; CEBECI e GÜRAKAN, 2003; DANIELSEN e WIND, 2003; HERREROS et al., 2005). Resistência a vancomicina, tipicamente, é o resultado da biossíntese de peptideoglicano com o sítio de reconhecimento do glicopeptídeo alterado. Microrganismos resistentes incorporam D-alanina-D-lactato ou D-alanina-D-serina no terminal do tetrapeptídeo do peptideoglicano, ao invés de D-alanina-D-alanina. Essa alteração reduz a afinidade do antibiótico pelo seu alvo, um mecanismo de resistência que tem sido associado a microrganismos intestinais, como *Lactobacillus*, resistentes intrinsecamente a vancomicina (WRIGHT, 2003). Muitas dessas bactérias têm uma longa história de uso seguro como probiótico e não existe indicação de que as mesmas são capazes de transferir a resistência para outras espécies (MATTILLA-SANDHOLM et al., 1999).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou susceptibilidade moderada a cloranfenicol, a tetraciclina e a eritromicina (Quadro 1). Resistência a

cloranfenicol e a tetraciclina foi descrita por HERREROS et al. (2005), contudo, linhagens de *Lactobacillus* apresentaram sensibilidade a esses dois antimicrobianos (CHARTERIS et al., 1998; TEMMERMAN et al., 2003; ARICI et al., 2004; ZHOU et al., 2005) e a eritromicina (CEBECI e GÜRAKAN, 2003; TEMMERMAN et al., 2003; ARICI et al., 2004; HERREROS et al., 2005; ZHOU et al., 2005).

Em relação aos  $\beta$ -lactâmicos, *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi resistente a cefoxitina, a cefotaxima, a cefaclor e a penicilina G e apresentou susceptibilidade moderada a cefalotina e a ampicilina (Quadro 1). O padrão de susceptibilidade a  $\beta$ -lactâmicos não é característico para *Lactobacillus*, uma vez que também apresentou variação em outros estudos. Bactérias do gênero *Lactobacillus* foram resistentes a cefoxitina (CHARTERIS et al., 1998; DANIELSEN e WIND, 2003; CEBECI e GÜRAKAN, 2003; HERREROS et al., 2005), sensíveis a cefalotina (ZHOU et al., 2005), a ampicilina e a penicilina G (CEBECI e GÜRAKAN, 2003; DANIELSEN e WIND, 2003; ZHOU et al., 2005), resistente a ampicilina (HERREROS et al., 2005) e a penicilina G (TEMMERMAN et al., 2003). O principal mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é a inativação enzimática dos mesmos pelas  $\beta$ -lactamases (BERGER-BÄCHI, 2002). Linhagens de *Lactobacillus* resistentes a  $\beta$ -lactâmicos não apresentaram atividade de  $\beta$ -lactamases e a impermeabilidade foi apontada como mecanismo de resistência a esses inibidores da síntese da parede celular (CHARTERIS et al., 1998).

Quadro 1 – Perfil de resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

| Antimicrobiano                | Classe              | Concentração<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Diâmetro do<br>halo (mm) | Classificação <sup>1</sup> |
|-------------------------------|---------------------|---|--------------------------|----------------------------|
| vancomicina                   | glicopeptídeo       | 30  | 7                        | R                          |
| cloranfenicol                 | cloranfenicol       | 30  | 14                       | MS                         |
| cefoxitina                    | $\beta$ - lactâmico | 30  | 12                       | R                          |
| cefotaxima                    | $\beta$ - lactâmico | 30  | 14                       | R                          |
| cefalexina <sup>2</sup>       | $\beta$ - lactâmico | 30  | 13                       | -                          |
| cefaclor                      | $\beta$ - lactâmico | 30  | 15                       | R                          |
| cefalotina                    | $\beta$ - lactâmico | 30  | 15                       | MS                         |
| ampicilina                    | $\beta$ - lactâmico | 10  | 13                       | MS                         |
| penicilina G                  | $\beta$ - lactâmico | 10 U.I.                                   | 15                       | R                          |
| sulfametoxol +<br>trimetropim | sulfa               | 25  | 0                        | R                          |
| sulfazotrim <sup>2</sup>      | sulfa               | 25  | 0                        | -                          |
| amicacina                     | aminoglicosídeo     | 30  | 0                        | R                          |
| estreptomina                  | aminoglicosídeo     | 10  | 9                        | R                          |
| neomicina <sup>2</sup>        | aminoglicosídeo     | 10  | 0                        | -                          |
| espectinomicina <sup>2</sup>  | aminoglicosídeo     | 10  | 9                        | -                          |
| gentamicina                   | aminoglicosídeo     | 10  | 0                        | R                          |
| tetraciclina                  | tetraciclina        | 30  | 15                       | MS                         |
| rifampicina                   | rifampicina         | 5   | 9                        | R                          |
| furazolidona                  | nitrofurano         | 15  | 0                        | R                          |
| nitrofurantoína               | nitrofurano         | 50  | 0                        | R                          |
| perfloxacina <sup>2</sup>     | quinolona           | 5   | 0                        | -                          |
| ácido nalidíxico              | quinolona           | 30  | 0                        | R                          |
| colistina                     | polimixina          | 10  | 0                        | R                          |
| eritromicina                  | macrolídeo          | 15  | 15                       | MS                         |
| espiramicina <sup>2</sup>     | macrolídeo          | 100                                       | 12                       | -                          |

<sup>1</sup> Os resultados são expressos como R (resistente), S (susceptível) ou MS (moderadamente susceptível) (CHARTERIS et al., 1998).

<sup>2</sup> Antimicrobianos não apresentados na tabela de classificação

Resistência a aminoglicosídeos foi observada em *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Quadro 1) e também em outras bactérias do gênero *Lactobacillus* (CHARTERIS et al., 1998; TEMMERMAN et al., 2003; DANIELSEN e WIND, 2003; ARICI et al., 2004; ZHOU et al., 2005; HERREROS et at., 2005). Esses agentes antimicrobianos catiônicos necessitam de um sistema de transporte de membrana dependente de energia, para entrarem na célula (BERGER-BÄCHI, 2002). Aminoglicosídeos possuem forte atividade contra aeróbios. Geralmente, essas bactérias apresentam alto potencial de membrana, o que facilita a entrada desses antimicrobianos por processo eletroforético ou por algum mecanismo de transporte não identificado (ELKINS e MULLIS, 2004). Ao contrário, os microrganismos anaeróbios são geralmente resistentes a aminoglicosídeos, em razão da impermeabilidade da membrana, que pode ser explicada pela diminuição do potencial de membrana em condições anaeróbias (Davis, 1987 citado por ELKINS e MULLIS, 2004), fato exacerbado em anaeróbios acidofílicos como *Lactobacillus*. Assim, o baixo potencial de membrana, para dirigir a entrada de aminoglicosídeos, pode explicar a impermeabilidade da membrana e a resistência intrínseca de *Lactobacillus* a esses antimicrobianos (ELKINS e MULLIS, 2004).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou resistência a rifampicina (Quadro 1), característica encontrada em várias linhagens de *Lactobacillus* (TEMMERMAN et al., 2003). Entretanto, sensibilidade a rifampicina também já foi observada em *Lactobacillus* (CHARTERIS et al., 1998; ZHOU et al., 2005). Resistência a esse antimicrobiano ocorre por mutação do alvo (RNA polimerase), que reduz a afinidade do antimicrobiano pela enzima (BERGER-BÄCHI, 2002). As várias mutações conferem níveis diferentes de resistência, dependendo da mutação e da natureza do novo aminoácido resultante (AUBRY-DAMON et al., 1998).

Em relação aos nitrofuranos, *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi resistente a nitrofurantoína e a furazolidona (Quadro 1). Resistência a nitrofurantoína também foi descrita por CHARTERIS et al (1998) e por HERREROS et at (2005) em *Lactobacillus*. Linhagens de *Clostridium* sp. isoladas do trato intestinal humano apresentaram resistência a nitrofuranos, pois foram capazes de convertê-los a

metabólitos com baixa atividade antimicrobiana (RAFII e HANSEN, 1998). A atividade antibacteriana das drogas contendo grupos nitro tem sido atribuída à conversão desses compostos pelas nitroredutases a intermediários tóxicos e instáveis (Mcosker e Fitzpatrick, 1994 citado por RAFII e HANSEN, 1998). Redução de nitrato não é comum entre as bactérias do gênero *Lactobacillus* (KANDER e WEISS, 1986). Essa característica pode explicar a resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 aos nitrofuranos. Entretanto, RAFII e HANSEN (1998) observaram que a resistência a nitrofurantoína não foi devida à perda da atividade de nitroredutase.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* (CHARTERIS et al., 1998; DANIELSEN e WIND, 2003; HERREROS et al., 2005) bem como, *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentaram resistência a sulfametoxol-trimetropim (Quadro 1). Bactérias do ácido láctico não possuem a via de síntese do ácido fólico, o alvo de sulfonamidas e trimetropim e, por isso, são resistentes intrinsecamente a esses agentes antimicrobianos (KATLA et al., 2001).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou resistência ao ácido nalidíxico e a perfloxacina (Quadro 1). Em outros estudos (CHARTERIS et al., 1998; CHARTERIS et al., 1998; ZHOU et al., 2005), linhagens de *Lactobacillus* também foram resistentes ao ácido nalidíxico. Resistência a quinolonas se deve, principalmente, a mutações na DNA girase e na topoisomerase IV, que são os alvos desses antimicrobianos (BERGER-BÄCHI, 2002).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são geralmente resistentes às principais classes de antimicrobianos como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfas e quinolonas (CHARTERIS et al., 1998), entretanto, a susceptibilidade dessas bactérias a agentes antimicrobianos é dependente da espécie (DANIELSEN e WIND, 2003). Muitos dos mecanismos de resistência em culturas probióticas são atribuídos a características intrínsecas complexas tais como, estrutura da parede celular ou propriedades metabólicas (KASTNER et al., 2006), sendo que a impermeabilidade é o mecanismo de resistência intrínseca mais frequentemente observada (CHARTERIS et al., 1998), entretanto, para alguns antimicrobianos esses mecanismos ainda não foram elucidados em *Lactobacillus*.

Tomados em conjunto, os resultados mostrados confirmam a diversidade de perfis de resistência em *Lactobacillus* de diferentes origens e demonstram a resistência a uma ampla gama de antimicrobianos. As bactérias do gênero *Lactobacillus* de maneira geral, apresentam resistência a aminoglicosídeos, a nitrofuranos e a quinolonas e variação do perfil de resistência dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e rifampicina.

*L. delbrueckii* UFV H2b20 possui resistência às principais classes de antimicrobianos utilizados na terapêutica humana e, possivelmente, é capaz de crescer na presença desses agentes e auxiliar na manutenção e no restabelecimento da microbiota intestinal durante terapia antibiótica.



### **4.3. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

O quadro 2 mostra os efeitos de fatores adversos sobre a CIM de agentes antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20. Demonstrou-se ampla diversidade nas respostas aos fatores estudados, tanto em relação ao efeito de um determinado fator aos diferentes antimicrobianos, quanto ao efeito dos diferentes fatores sobre a CIM de um dado antimicrobiano.

A figura 2 exemplifica a determinação da CIM em *L. delbrueckii* UFV H2b20, demonstrando o efeito de diferentes concentrações de estreptomicina sobre o crescimento desta bactéria.

#### **4.3.1. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a aminoglicosídeos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

A figura 3 demonstra o efeito de choque térmico, choque ácido, sais biliares e peróxido de hidrogênio sobre a resistência a canamicina, a neomicina, a estreptomicina, a espectinomicina e a gentamicina em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

Aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos catiônicos de amplo espectro que requerem um sistema de transporte de membrana dependente de energia para entrarem na célula. Dentro da célula, eles se ligam ao rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo. A interação aminoglicosídeo-ribossomo provoca erro na leitura do mRNA e terminação prematura da tradução, levando à síntese de proteínas não funcionais (BERGER-BÄCHI, 2002; WRIGHT, 2003).

Microrganismos anaeróbios, como *Lactobacillus*, são intrinsecamente resistentes a aminoglicosídeos (Davis, 1987 citado por ELKINS e MULLIS, 2004), como já mencionado. Qualquer condição ambiental capaz de alterar a permeabilidade da membrana pode diminuir a resistência intrínseca a esses antimicrobianos, já que isto irá facilitar a entrada de aminoglicosídeos na célula, possibilitando a ligação da droga ao ribossomo.

Quadro 2 - Efeito de diferentes condições de estresse sobre a Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

| Classe               | Antimicrobianos  | CIM <sup>1</sup><br>controle | CIM<br>choque térmico <sup>2</sup> | CIM<br>choque ácido <sup>3</sup> | CIM<br>sais biliares <sup>4</sup> | CIM<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>5</sup> |
|----------------------|------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| aminoglicosídeos     | estreptomicina   | 40                           | 40                                 | 30                               | 20                                | 50  |
|                      | canamicina       | 180                          | 160                                | 70                               | 30                                | 180   |
|                      | neomicina        | 110                          | 160                                | 170                              | 70                                | 160   |
|                      | espectinomicina  | 40                           | 20                                 | 20                               | 10                                | 20  |
|                      | gentamicina      | 30                           | 30                                 | 50                               | <10                               | 20  |
| sulfa                | sulfametoxol     | >1000                        | >1000                              | >1000                            | >1000                             | >1000   |
| nitrofuranos         | nitrofurantoína  | 110                          | 70                                 | <60                              | 70                                | 90  |
|                      | furazolidona     | >1000                        | 50<CIM<100                         | 100<CIM<500                      | >1000                             | 100<CIM<500                                       |
| quinolona            | ácido nalidíxico | >200                         | >200                               | >200                             | >200                              | >200  |
| cloranfenicol        | cloranfenicol    | 10                           | 10                                 | 10                               | <1,25                             | 20  |
| tetraciclina         | tetraciclina     | 10                           | 2,5                                | 2,5                              | <1,25                             | 5   |
| macrolídeos          | espiramicina     | 10                           | 10                                 | 20                               | <1,25                             | 5   |
|                      | eritromicina     | <1,25                        | <1,25                              | 2,5                              | <1,25                             | <1,25   |
| $\beta$ - lactâmicos | cefalexina       | 10                           | 10                                 | 5                                | 2,5                               | 5   |
|                      | cefadroxil       | 10                           | 5                                  | 5                                | <1,25                             | 2,5   |
|                      | ampicilina       | 0,8                          | 0,7                                | 0,8                              | 0,3                               | 0,7   |

A Concentração Inibitória Mínima corresponde à menor concentração do antimicrobiano presente no meio MRS, a partir da qual não se detectaram diferenças significativas na densidade óptica final pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> CIM (Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

<sup>2</sup> Choque térmico (50°C/30 minutos)

<sup>3</sup> Choque ácido (pH 3,5/30 minutos)

<sup>4</sup> Exposição a sais biliares (0,5%/2 horas)

<sup>5</sup> Presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

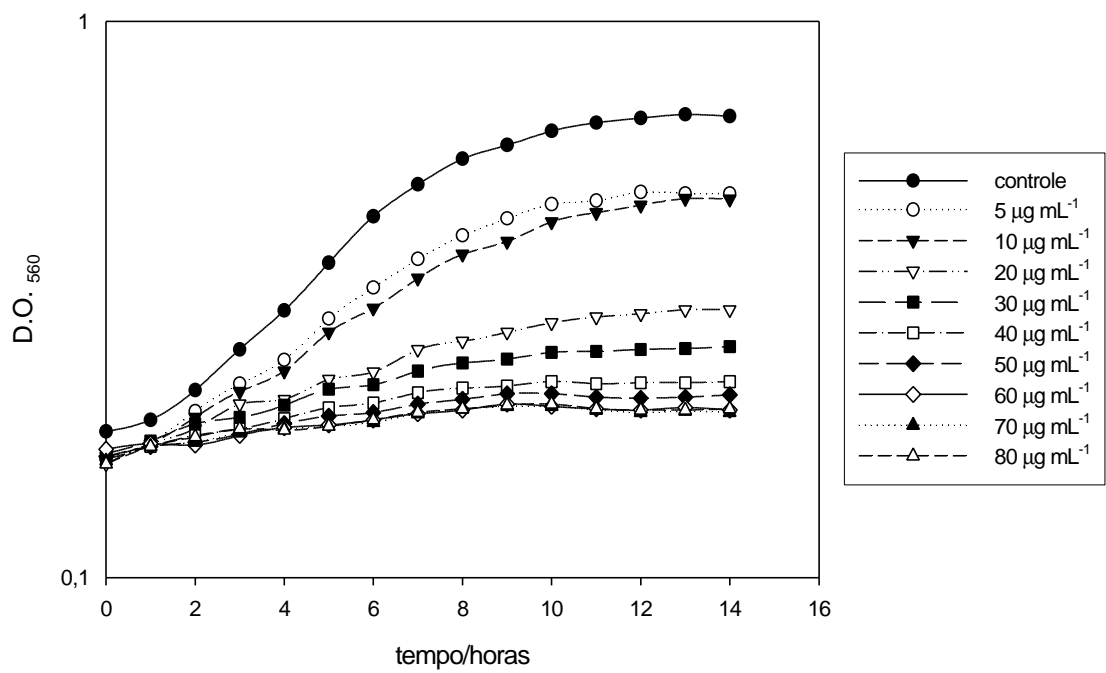


Figura 2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram cultivadas em caldo MRS, acrescido de diferentes concentrações de estreptomicina, em condição microaerofílica a 37°C. Crescimento celular foi acompanhado pela medida de densidade óptica a 560nm (D.O.<sub>560</sub>).

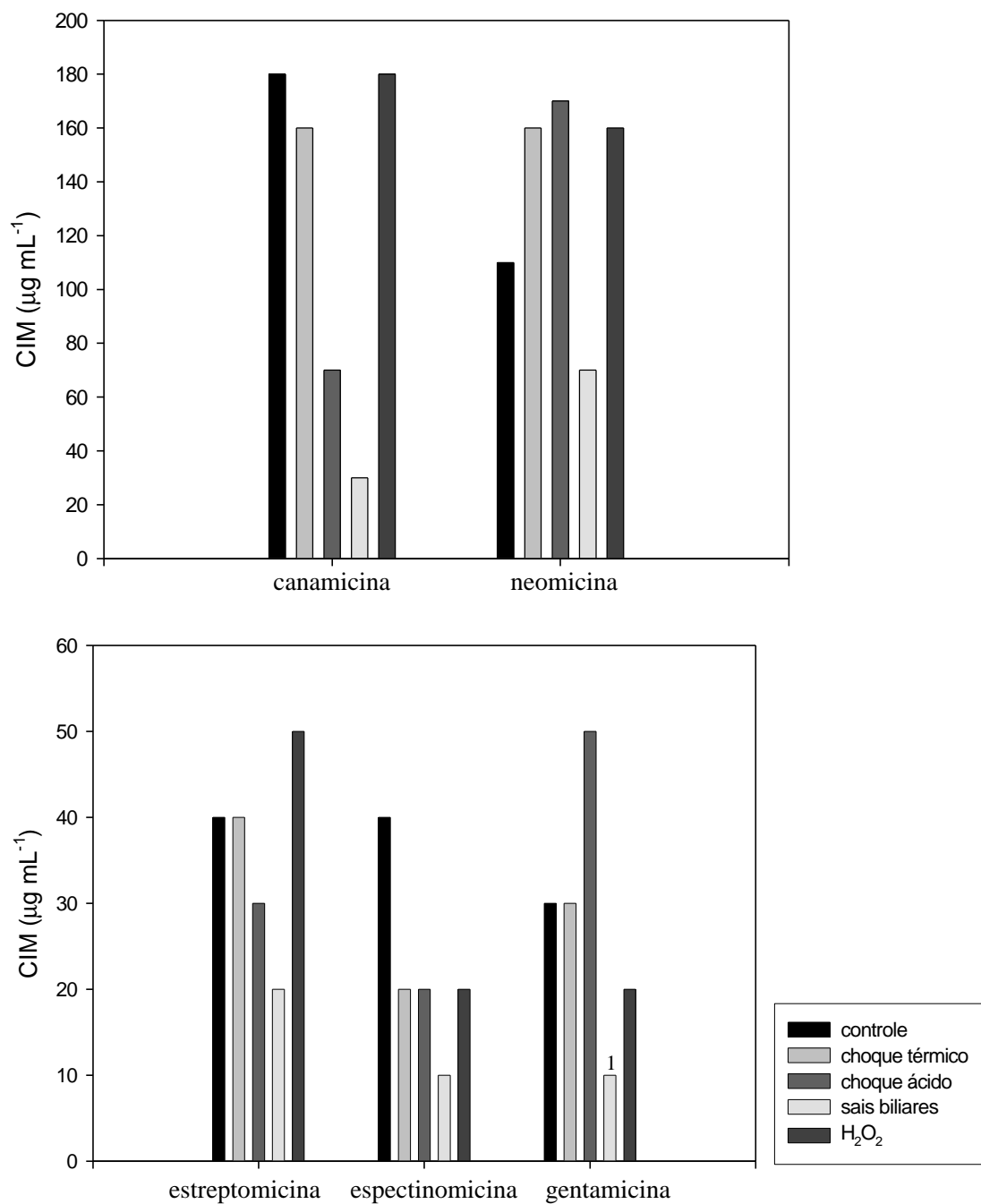


Figura 3 - Efeito de diferentes fatores de estresse sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de aminoglicosídeos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. Choque térmico (50°C/30 minutos), choque ácido (pH 3,5/30 minutos), sais biliares (0,5%/2 horas), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µg mL<sup>-1</sup>). As células foram cultivadas em caldo MRS, acrescido de diferentes concentrações de antimicrobianos, em condição microaerofílica a 37°C.

<sup>1</sup> CIM < 10 µg mL<sup>-1</sup>

#### **4.3.1.1. Efeito do choque térmico sobre a resistência a aminoglicosídeos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

O choque térmico não provocou o mesmo efeito sobre a CIM dos cinco aminoglicosídeos testados, apesar desses antimicrobianos possuírem o mesmo alvo (ribossomo) e o mesmo mecanismo de ação. Essa condição de estresse diminuiu a resistência a canamicina e a espectinomicina, aumentou a resistência a neomicina e não alterou a CIM de estreptomicina e de gentamicina em *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 3).

Alterações na permeabilidade da membrana, causada pelo choque térmico, podem ter facilitado a entrada de aminoglicosídeos na célula, diminuindo a resistência a canamicina e a espectinomicina (Figura 3). Por outro lado, a exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao choque térmico pode ter provocado modificações no ribossomo, alterando a afinidade de neomicina, de estreptomicina e de gentamicina pelo seu alvo. Isso pode ter compensado a entrada de aminoglicosídeos devida ao aumento da permeabilidade da membrana, e impedido ou minimizado os efeitos desses três aminoglicosídeos na célula bacteriana.

Um choque térmico (~10 °C acima da temperatura ótima de crescimento) é, geralmente, seguido pela indução transitória de proteínas do choque térmico em várias bactérias Gram-positivas, incluindo espécies de *Lactobacillus*. Essas proteínas promovem o correto dobramento de polipeptídeos nascentes, montagem dos complexos de proteínas e degradação de proteínas (ANGELIS e GOBBETTI, 2004). Em *L. delbrueckii* UFV H2b20, o choque térmico (50°C/30 minutos) promoveu termotolerância (MONTEIRO, 1999) e aumentou a resistência das células quando submetidas ao processo de desidratação (FURTADO, 2001).

O efeito principal induzido pela temperatura alta é a desnaturação de proteínas e suas subseqüentes agregações, desestabilização de estruturas como ribossomo e de macromoléculas como RNA e DNA e alteração da fluidez da membrana (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

Não se pode generalizar o efeito do choque térmico sobre a resistência a aminoglicosídeos, já que esta condição provocou efeitos diferentes entre os antimicrobianos dessa classe.

#### **4.3.1.2. Efeito do choque ácido sobre a resistência a aminoglicosídeos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

Em *L. delbrueckii* UFV H2b20, o choque ácido também ocasionou efeitos diversos sobre a resistência a aminoglicosídeos. Essa condição diminuiu a resistência a canamicina, a estreptomicina e a espectinomicina. Entretanto, aumentou a CIM de neomicina e de gentamicina. Nenhum dos aminoglicosídeos testados manteve a mesma CIM quando a bactéria foi submetida ao choque ácido (Figura 3).

A acidificação interna pode dissipar a força próton-motora, reduzir a atividade de enzimas sensíveis ao ácido, danificar proteínas e DNA (VAN DE GUCHTE et al., 2002). A exposição das células a baixo pH pode ter ocasionado aumento da permeabilidade da membrana, transiente, mas ainda assim eficiente para facilitar a entrada de canamicina, de estreptomicina e de espectinomicina na célula, com conseqüente diminuição da resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a esses aminoglicosídeos. Porém, o choque ácido desencadeou algum mecanismo que protegeu a célula dos efeitos antimicrobianos de neomicina e de gentamicina, que pode ter compensado a entrada dos mesmos, aumentando a CIM desses aminoglicosídeos (Figura 3).

Estudos proteômicos mostraram que várias proteínas são induzidas durante a adaptação ao ácido em bactérias do ácido láctico, entretanto, a identidade e o número dessas proteínas variam entre as diferentes bactérias (VAN DE GUCHTE et al., 2002). Em *L. delbrueckii* UFV H2b20, o choque ácido (pH 3,5/30 minutos) aumentou a resistência das células quando expostas a pH 2,5 por duas horas e meia (MONTEIRO, 1999) e aumentou a tolerância das mesmas, quando submetidas à desidratação (FURTADO, 2001).

Como para o choque térmico, não se pode generalizar o efeito do choque ácido sobre a resistência a aminoglicosídeos, já que essa condição também ocasionou efeitos diferentes sobre essa classe de antimicrobianos.

#### **4.3.1.3. Efeito de sais biliares sobre a resistência a aminoglicosídeos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares conjugados foi a condição que mais afetou a resistência a canamicina, a neomicina, a estreptomicina, a espectinomicina e a gentamicina. A bactéria apresentou diminuição da resistência a todos os aminoglicosídeos testados e, nesta condição, apresentou os menores valores de CIM (Figura 3).

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a 0,5% de sais biliares conjugados, por duas horas, representa uma condição adversa, já que, nessa concentração a bactéria não apresentou crescimento (resultado não mostrado). Essas condições correspondem, respectivamente, à concentração média de sais biliares encontrada no intestino delgado e ao tempo médio que o alimento permanece no intestino delgado, respectivamente (CHARTERIS et al., 1998; MADUREIRA et al., 2005).

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares pode ter alterado a estrutura da membrana celular, com aumento da permeabilidade da mesma, o que possibilitou a entrada dos aminoglicosídeos, com conseqüente diminuição da CIM desses antimicrobianos. Sais biliares afetam os fosfolipídeos e as proteínas de membrana, desestruturando as membranas celulares e alterando a estabilidade de macromoléculas como RNA e DNA (VAN DE GUCHTE et al., 2002; BEGLEY et al., 2005).

A presença de 0,5% de sais biliares conjugados resultou na perda de resistência a aminoglicosídeos na maioria das linhagens de *Lactobacillus*. (CHARTERIS et al., 2000; ELKINS e MULLIS, 2004). A presença de sais biliares aumentou a permeabilidade da membrana celular e compensou a falta de

transporte dos antibióticos, alterando a resistência dessas bactérias a aminoglicosídeos (CHARTERIS et al., 2000).

Presença de sais biliares foi a única condição estudada que provocou o mesmo efeito sobre a resistência a todos os aminoglicosídeos testados em *L. delbrueckii* UFV H2b20, embora com intensidades diferentes (Figura 3). Apesar das diferenças nas metodologias utilizadas, *L. delbrueckii* UFV H2b20, tal qual outras bactérias do gênero *Lactobacillus* descritas, apresentou diminuição da resistência a aminoglicosídeos, quando exposto a sais biliares conjugados em concentração fisiológica.

#### **4.3.1.4. Efeito de peróxido de hidrogênio sobre a resistência a aminoglicosídeos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a peróxido de hidrogênio também provocou efeitos diversos sobre a resistência a aminoglicosídeos. A presença de peróxido de hidrogênio diminuiu a resistência da bactéria a espectinomicina e a gentamicina, aumentou a resistência a neomicina e a estreptomicina e não alterou a CIM de canamicina (Figura 3).

A concentração de peróxido de hidrogênio utilizada neste estudo, 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representa uma condição adversa para *L. delbrueckii* UFV H2b20 pois, como já foi mencionado, essa concentração diminuiu a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ) (Figura 1).

Peróxido de hidrogênio pode provocar peroxidação de lipídeos, aumentando a permeabilidade da membrana (KONG e DAVISON, 1980). A exposição das células a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, pode ter aumentado a permeabilidade da membrana, facilitando a entrada de espectinomicina e de gentamicina na célula, com conseqüente diminuição da CIM desses dois aminoglicosídeos.

O peróxido de hidrogênio pode ter provocado alterações na estrutura de neomicina, de estreptomicina e de canamicina, prejudicando a ligação dos mesmos



ao rRNA 16S de *L. delbrueckii* UFV H2b20, o que levou à manutenção da CIM de canamicina e ao aumento da CIM de neomicina e estreptomicina.

#### **4.3.2. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a nitrofuranos em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

A figura 4 demonstra o efeito de choque térmico, choque ácido, sais biliares e peróxido de hidrogênio sobre a resistência a nitrofurantoína e a furazolidona em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

Os nitrofuranos são agentes antibacterianos sintéticos, freqüentemente utilizados no tratamento de infecções nos tratos digestivo e urinário (SHAHVERDI et al., 2004). Em adição aos intermediários tóxicos e instáveis produzidos pela redução de nitrofurantoína, inibição da síntese protéica e alteração no DNA podem estar envolvidas na toxicidade desse antimicrobiano (Mcosker e Fitzpatrick, 1994 citado por RAFII e HANSEN, 1998).

Em *L. delbrueckii* UFV H2b20, o choque térmico, o choque ácido e a presença de peróxido de hidrogênio provocaram diminuição da resistência a nitrofurantoína e a furazolidona (Figura 4). Os choques térmico e ácido, possivelmente, provocaram alterações transitórias nas células que as tornaram mais sensíveis aos nitrofuranos. O peróxido de hidrogênio pode ter reagido com os nitrofuranos, convertendo-os em compostos tóxicos para a célula.

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares conjugados provocou diminuição da resistência a nitrofurantoína e não alterou a resistência a furazolidona até a concentração máxima testada (Figura 4). Excluindo sulfametoxol e ácido nalidíxico que não tiveram a CIM alterada por nenhuma das quatro condições de estresse estudadas (Quadro 2), furazolidona foi o único antimicrobiano em que a CIM não foi modificada após a exposição de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares. Essa condição, possivelmente, provocou alterações nas células que as tornaram mais sensíveis a nitrofurantoína, mas que não foram suficientes para alterar a resistência a furazolidona.

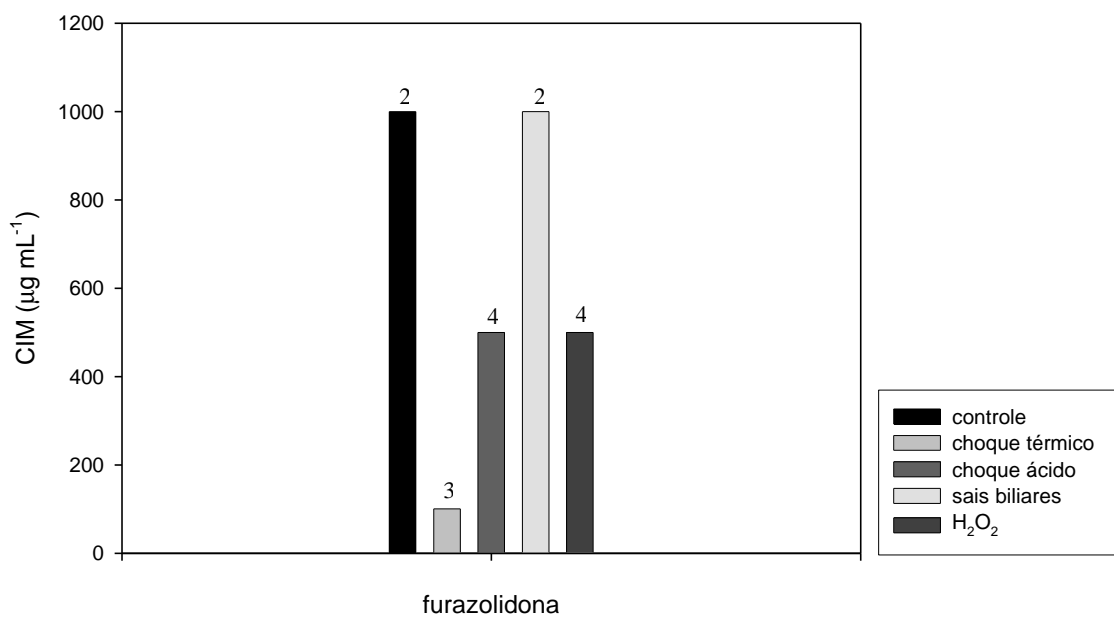
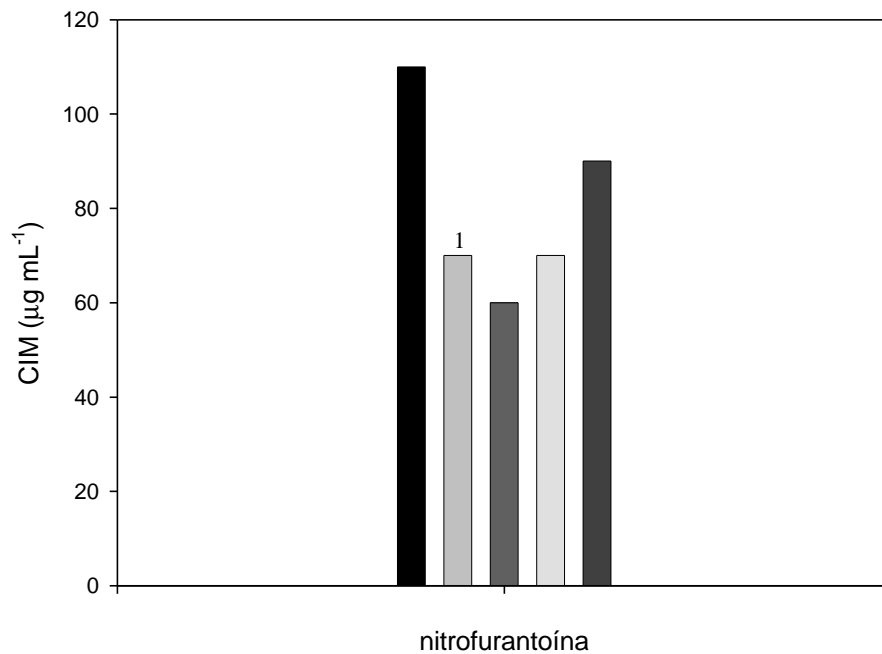


Figura 4 - Efeito de diferentes fatores de estresse sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de nitrofuranos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. Choque térmico (50°C/30 minutos), choque ácido (pH 3,5/30 minutos), sais biliares (0,5 %/2 horas), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20µg mL<sup>-1</sup>). As células foram cultivadas em caldo MRS, acrescido de diferentes concentrações de antimicrobianos, em condição microaerofílica a 37°C.

<sup>1</sup> CIM < 60 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> CIM > 1000 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>3</sup> 50 < CIM < 100 µg mL<sup>-1</sup>

<sup>4</sup> 100 < CIM < 500 µg mL<sup>-1</sup>

#### 4.3.3. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a $\beta$ -lactâmicos em *L. delbrueckii* UFV H2b20

As condições ambientais estudadas afetaram as CIMs dos  $\beta$ -lactâmicos cefalexina, cefadroxil e ampicilina de maneira diversa (Figura 5). A resistência a cefadroxil, mostrou-se mais afetada pelas quatro condições estudadas.

O grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, que inclui as penicilinas e as cefalosporinas, atua na inibição da biossíntese da parede celular bacteriana, bloqueando a reação de transpeptidação, responsável pela formação de um peptidoglicano mecanicamente forte (WALSH, 2003).

O choque térmico não provocou o mesmo efeito sobre a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *L. delbrueckii* UFV H2b20. Essa condição diminuiu a resistência a cefadroxil e a ampicilina e não alterou a CIM de cefalexina (Figura 5). O choque térmico pode ter provocado alteração na parede celular bacteriana, tornando as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 mais susceptíveis a ação de cefadroxil e ampicilina.

O choque ácido diminuiu a resistência a cefalexina e a cefadroxil e não alterou a CIM de ampicilina em *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 5). O choque ácido pode ter provocado alterações nas células que as tornaram mais sensíveis aos efeitos de cefalexina e cefadroxil. Descartam-se alterações pelo baixo pH nos antibióticos diretamente, pois estes foram adicionados às células após a retirada do ácido. Mesmo que as alterações tenham sido transitórias, estas foram suficientes para que o estado celular inicial não fosse recuperado.

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a sais biliares conjugados provocou diminuição da resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos investigados, com redução significativa das CIMs dos mesmos (Figura 5), demonstrando que o tratamento com sais biliares tornou a bactéria mais susceptível a cefadroxil, a cefalexina e a ampicilina.

CHARTERIS et al (2000) mostraram que sais biliares conjugados afetaram a resistência de *Lactobacillus* a ampicilina, sendo essa alteração

dependente da linhagem. Do total de treze linhagens de *Lactobacillus* testadas, seis apresentaram diminuição da resistência a ampicilina.

*L. delbrueckii* UFV H2b20 é resistente a altas concentrações de peróxido de hidrogênio (Figura 1). Entretanto, a presença de peróxido de hidrogênio provocou diminuição da resistência aos três  $\beta$ -lactâmicos testados (Figura 5). O peróxido de hidrogênio pode ter provocado alterações na parede celular, tornando-a mais susceptível aos efeitos de ampicilina, cefadroxil e cefalexina.

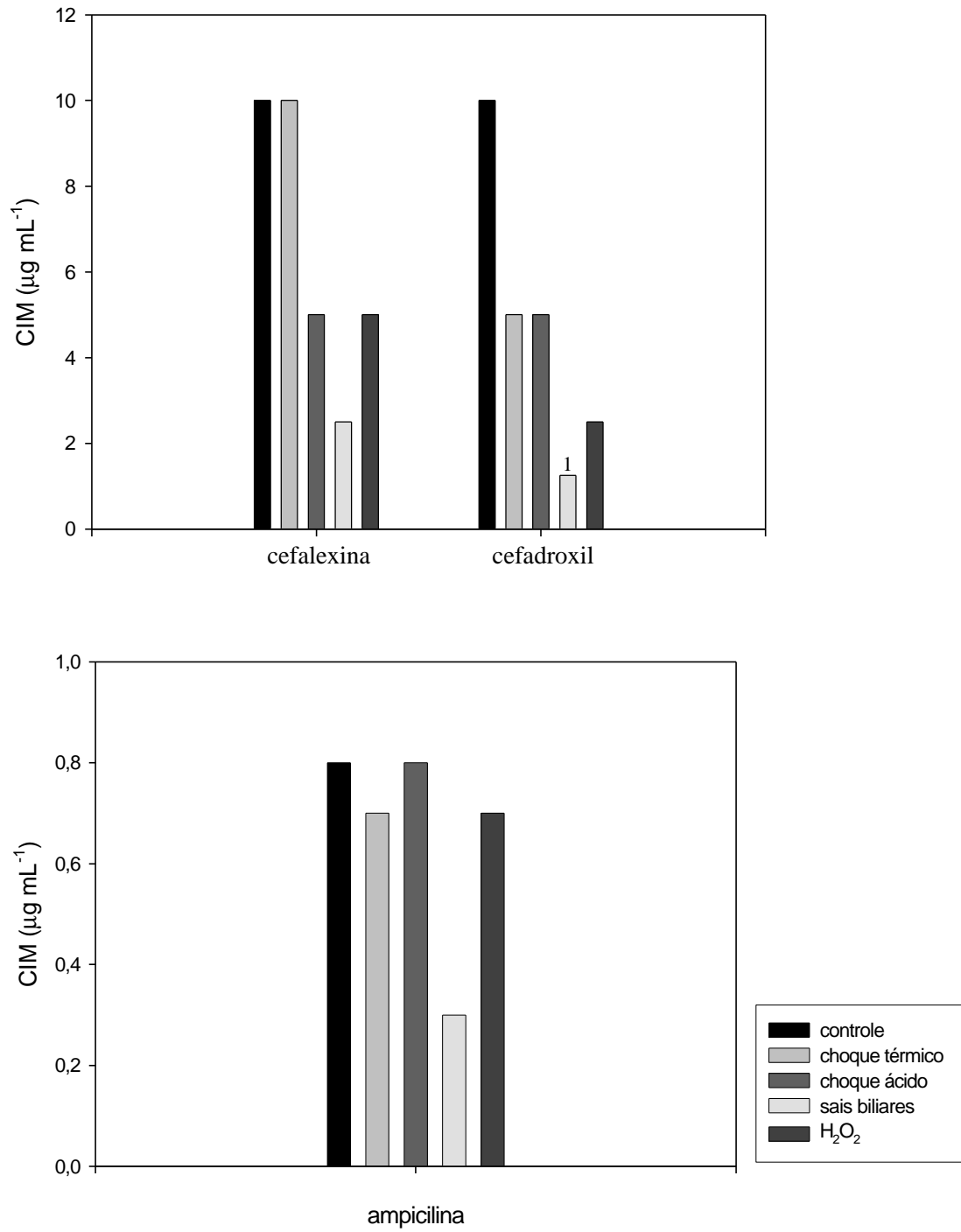


Figura 5 - Efeito de diferentes fatores de estresse sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de  $\beta$ -lactâmicos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. Choque térmico (50°C/30 minutos), choque ácido (pH 3,5/30 minutos), sais biliares (0,5%/2 horas), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µg mL<sup>-1</sup>). As células foram cultivadas em caldo MRS, acrescido de diferentes concentrações de antimicrobianos, em condição microaerofílica a 37°C.

<sup>1</sup> CIM < 1,25 µg mL<sup>-1</sup>

#### 4.3.4. Efeito de condições de estresse sobre a resistência a outros antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20

Os antimicrobianos cloranfenicol, tetraciclina e espiramicina pertencem a classes diferentes, mas, atuam na inibição da biossíntese de proteínas bacterianas. O efeito de choque térmico, choque ácido, sais biliares e peróxido de hidrogênio sobre a resistência a esses antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20 é mostrado na figura 6. A resistência a tetraciclina, mostrou-se mais afetada pelas quatro condições estudadas.

Cloranfenicol é um agente bacteriostático, não carregado, que se liga reversivelmente à subunidade 50S do ribossomo e bloqueia a ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo, inibindo a formação da ligação peptídica (STRATTON, 2002).

Tetraciclina é um antimicrobiano também bacteriostático que se liga à subunidade 30S do ribossomo e bloqueia a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio acceptor no ribossomo (WALSH, 2003).

Espiramicina inibe a síntese protéica na subunidade 50S do ribossomo, por estimular a dissociação da molécula aminoacil-tRNA do ribossomo durante a etapa de alongamento. Isto leva à terminação precoce da cadeia polipeptídica e à parada reversível da síntese de proteínas (BERGER-BÄCHI, 2002).

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, submetidas ao choque térmico, não apresentaram alteração da resistência a cloranfenicol e a espiramicina, entretanto, a CIM de tetraciclina diminuiu de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 6). Embora esses três antimicrobianos atuem sobre o mesmo alvo (ribossomo), o choque térmico não foi capaz de provocar alteração na resistência a cloranfenicol e a espiramicina, mas essa condição aumentou a sensibilidade das células à tetraciclina.

O choque ácido não alterou a resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a cloranfenicol, mas diminuiu a resistência a tetraciclina e aumentou significativamente a CIM de espiramicina (de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 6) e de eritromicina (de  $<1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Quadro 2). O

choque ácido pode ter provocado alterações transitórias, mas suficientes para provocar modificações na subunidade 50S do ribossomo, que dificultaram a ligação dos macrolídeos ao ribossomo. Apesar do cloranfenicol se ligar também a essa subunidade, a CIM desse antimicrobiano foi mantida. Em relação à tetraciclina, o choque ácido tornou as células mais sensíveis a esse antimicrobiano.

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 aos sais biliares provocou diminuição da resistência a cloranfenicol, a tetraciclina e a espiramicina, com redução expressiva das CIMs (de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para  $<1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos mesmos (Figura 6). Essa condição aumentou a susceptibilidade da bactéria a esses antimicrobianos.

Segundo CHARTERIS et al (2000), a presença de sais biliares provocou alteração da resistência a cloranfenicol e a tetraciclina em *Lactobacillus*, sendo esta modificação dependente da linhagem. Entre treze linhagens de *Lactobacillus* testadas, nove tornaram-se sensíveis a cloranfenicol e oito apresentaram diminuição da resistência a tetraciclina. Entretanto, ELKINS e MULLIS (2004) observaram que a resistência a cloranfenicol e a tetraciclina não foi alterada pela presença de sais biliares. Segundo os autores, agentes com resíduos hidrofóbicos, como esses antimicrobianos, possuem menor dificuldade em atravessar a membrana e, por isso, a resistência não pode ser alterada pela presença de sais biliares em concentrações fisiológicas. A diferença encontrada nos dois estudos pode ser devida às metodologias utilizadas. Para determinação da resistência, ELKINS e MULLIS (2004) utilizaram o método de difusão em meio sólido e a exposição a sais biliares foi constante durante todo o tempo de crescimento bacteriano. Diferentemente dessa metodologia, a determinação da CIM em *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi feita pelo método de microdiluição em meio líquido e a bactéria foi exposta a 0,5% de sais biliares por duas horas, anteriormente ao desafio com os antimicrobianos.

Apesar dos antimicrobianos cloranfenicol, tetraciclina e espiramicina pertencerem a classes diferentes, o efeito de sais biliares sobre a resistência a esses antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20 não variou, sendo que todos apresentaram diminuição da CIM.

Diminuição da resistência a tetraciclina e a espiramicina e aumento da CIM de cloranfenicol (de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi observado em *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao peróxido de hidrogênio (Figura 6).

A presença de peróxido de hidrogênio tornou a bactéria mais susceptível a tetraciclina e a espiramicina. Por outro lado, o peróxido de hidrogênio pode ter reagido com o cloranfenicol, prejudicando a sua ligação à subunidade 50S do ribossomo, com conseqüente aumento da resistência a esse antimicrobiano.



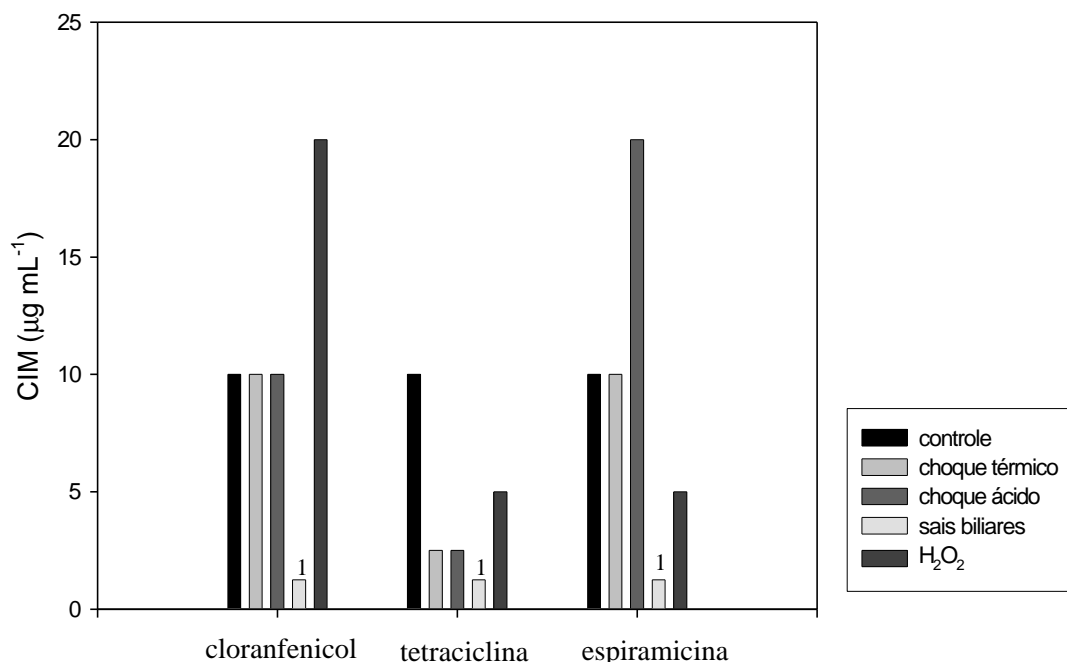


Figura 6 - Efeito de diferentes fatores de estresse sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de outros antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. Choque térmico (50°C/30 minutos), choque ácido (pH 3,5/30 minutos), sais biliares (0,5%/2 horas), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µg mL<sup>-1</sup>). As células foram cultivadas em caldo MRS, acrescido de diferentes concentrações de antimicrobianos, em condição microaerofílica a 37°C.

<sup>1</sup> CIM < 1,25 µg mL<sup>-1</sup>

## 5. CONCLUSÕES

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 é capaz de crescer em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, sendo o crescimento observado em até  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  deste composto e a inibição completa do crescimento ocorrendo a  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

*L. delbrueckii* UFV H2b20 é resistente às principais classes de antimicrobianos, como: aminoglicosídeos, quinolonas, sulfas, alguns  $\beta$ -lactâmicos, nitrofuranos, vancomicina e colistina. Apresenta susceptibilidade moderada a cloranfenicol, a tetraciclina, a cefalotina, a ampicilina e a tetraciclina.

O resultado do efeito de condições de estresse sobre a resistência a antimicrobianos demonstra ampla diversidade nas respostas ao choque térmico, ao choque ácido e à presença de peróxido de hidrogênio, tanto em relação ao efeito de um determinado fator aos diferentes antimicrobianos, quanto ao efeito desses fatores sobre a CIM de um dado antimicrobiano. Há similaridade no efeito de exposição a sais biliares sobre a resistência aos diferentes antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

O padrão de resistência a antimicrobianos em *L. delbrueckii* UFV H2b20 não foi mantido quando a bactéria foi submetida a condições adversas que se assemelham às encontradas durante o processamento industrial do produto probiótico e a passagem pelo trato gastrointestinal. É importante ressaltar que estudos *in vivo* ou em meio com composição próxima à encontrada no trato gastrointestinal podem esclarecer se as alterações no padrão de resistência observadas neste trabalho também ocorrem *in vivo*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, M. M. S. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo “In Vitro” e efeito de métodos de preservação de sua atividade.** In: Ciência e Tecnologia de Alimentos. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1988.

AMANATIDOU, A., SMID, E. J., BENNIK, M. H. J., GORRIS, L. G. M. Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 87-94, 2001.

ANGELIS, M. D., GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. **Proteomics**, v. 4, p. 106-122, 2004.

ARICI, M., BILGIN, B., SAGDIC, O., OZDEMIR, C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiology**, v. 21, p. 19-24, 2004.

AUBRY-DAMON, H., SOUSSY, C. J., COURVALIN, P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2590-2594, 1998.

BEGLEY, M., GAHAN, C. G. M., HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International Journal Medical Microbiology**, v. 292, p. 27-35, 2002.

CEBECI, A., CÜRAKAN, C. Properties of potencial probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, v. 20, p. 511-518, 2003.

CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1636-1643, 1998.

CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., COLLINS, J. K. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1369-1376, 2000.

COEURET, V., GUEGUEN, M., VERNOUX, J. P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotics products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 147-156, 2004.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, p. 269-280, 1987.

DANIELSEN, M., WIND A. Susceptibility of *Lactobacillus* ssp to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 1-11, 2003.

ELKINS C. A., MULLIS L. B. Bile mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7200-7209, 2004.

FENTEN, A., BARREAU, C., BIZET, C., LAGRANGE, P. H., PHILIPPON, A. *Lactobacillus* species identification, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 729-733, 1999.

FLORESTA, F. A. **Análise da região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20: Filogenia e presença de seqüência de inserção putativa.** In: Microbiologia Agrícola, pp. 54. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

FURTADO, W. C. A. **Efeito de choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite em pó.** In Microbiologia Agrícola, pp. 34. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001.

GAGNON, G., KHEADR, E. E., BLAY, G. L., FLISS, I. *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacteria strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 69-78, 2004.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 755-773, 2003.

HERREROS, M. A., SANDOVAL, H., GONZÁLEZ, L., CASTRO, J. M., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a spanish goat's milk cheese). **Food Microbiology**, v. 22, p. 455-459, 2005.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., HUIS IN'T VELT, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOOKER, K. D., DIPIRO, J. T. Effect of antimicrobial therapy on bowel flora. **Clinical Pharm**, v. 42, p. 2-7, 1988.

KANDLER, O., WEISS, N. Regular , Nonsporing Gram-Positive Rods. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, Baltimore: Willians and Wilkins. Ninth Edition, International Edition, 1986.

KASTNER, S., PERRETTEN, V., BLEULER, H., HUGENSCHMIDT, G., LACROIX, C., MEILE, L. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 145-155, 2006.

KATLA, A. K., KRUSE, H., JOHNSEN, G., HERIKSTAD, H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 147-152, 2001.

KLAENHAMMER, T., ALTERMANN, E., ARIGONI, F., BOLOTIN, A., BREIDT, F., BROADBENT, J., CANO, R., CHAILLOU, S., DEUTSCHER, J., GASSON, M., VAN DE GUCHTE, M., GUZZO, J., HARTKE, A., HAWKINS, T., HOLS, P., HUTKINS, R., KLEEREBEZEM, M., KOK, J., KUIPERS, O., LUBBERS, M., MAGUIM, E., McKAY, L., MILLS, D., NAUTA, A., OVERBEEK, R., PEL, H., PRIDMORE, D., SAIER, M., VAN SINDEREN, D., SOROKIN, A., STEELE, J., O'SULLIVAN, D., DE VOS, WILLEM., WEIMER, B., ZAGOREC, M., SIEZEN, R. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 29-58, 2002.

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

KONG, S., DAVISON, A. J. The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, OH, e<sup>-</sup> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in free radical damage to biological systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 204, p. 18-29, 1980.

KULLISAAR, T., ZILMER, M., MIKELSAAR, M., VIHALEM, T., ANNUK, H., KAIRANE, C., KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 215-224, 2002.

LEVY, J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000.

LIONG, M. T., SHAH, N. P. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 391-398, 2005.

MADDEN, J. A. J., PLUMMER, S. F., TANG, J., GARAIOVA, I., PLUMMER, N. T., HERBISON, M., HUNTER, J. O., SHIMADA, T., CHENG, L., SHIRAKAWA, T. Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1091-1097, 2005.

MADUREIRA, A. R., PEREIRA, C. I., TRUSZKOWSKA, K., GOMES, A. M., PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 921-927, 2005.

MARAGKOUidakis, P. A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, C., KALANTZOPOULOS, G., POT, B., TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 189-199, 2006.

MATTILA-SANDHOLM, T., MÄTTÖ, J., SAARELA, M. Lactic acid bacteria with claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 25-35, 1999.

MATTILA-SANDHOLM, T., MYLLÄRINEN, P., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173-182, 2002.

MARTY-TEYSSET, C., TORRE, F., GAREL, J. R. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 262-267, 2000.

MATHUR S., SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 105, p. 281-295, 2005.

MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. In: Microbiologia Agrícola, pp. 59. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999.

MOUBARECK, C., GAVINI, F., VAUGIEN, L., BUTEL, M. J., DOUCET-POPULAIRE, F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 38-44, 2005.

MOREIRA, M. A. S., OLIVEIRA, J. A., TEIXEIRA, L. M., MORAES, C. A. Detection of a cloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolates from poultry carcass. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 75-81, 2005.

MOSER, S. A., SAVAGE, D. C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3476-3480, 2001.

NCCLS. **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria**: Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M11-A6, Wayne, Pennsylvania USA, 2004.

NEUMANN, E., OLIVEIRA, M. A., CABRAL, C. M., MOURA, L. N., NICOLI, J.R., VIEIRA, E. C., CARA, D. C., PODOPRIGORA, G. I., VIEIRA, L. Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-4573, 1998.

NEVES, J. T. M. **Caracterização da região codificadora de RNA ribossomal 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. In: Microbiologia Agrícola, pp. 46. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998.

NEVES, J. T. M. **Características moleculares e identificação de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. In: Microbiologia Agrícola, pp. 151. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

PLUMMER, S. F., GARAIOVA, I., SARVOTHAM, T., COTTRELL, S. L., SCOULLER, S., WEAVER, M. A., TANG, J., DEE, P., HUNTER, J. Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 69-74, 2005.

PUTMAN, M., VAN VEEN, H. W., KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology Molecular Biological Revists**, v. 64, p. 672-693, 2000.

RAFII, F., HANSEN, E. B. J. Isolation of nitrofurantoin-resistant mutants of nitroreductase-producing *Clostridium* sp. strains from the human intestinal tract. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1121-1126, 1998.



RALLU, R., GRUSS, A., EHRLICH, S. D., MAGUIN, E. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular signals. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 517-528, 2000.

REID, G., SANDERS, M. E., GASKINS, H. R., GIBSON, G. R., MERCENIER, A., RASTALL, R., ROBERFROID, M., ROWLAND, I., CHERBUT, C., KLAENHAMMER, T. R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 37, p. 105-118, 2003.

RIBEIRO, M. A. **Aspectos da Produção de Peróxido de Hidrogênio e Inibição de Bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. In: Microbiologia Agrícola, pp. 60. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MATTO, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SALMINEM, S., VON WRIGHT, A., MORELLI, L., MARTEAU, P., BRASSART, D., VOS DE, W.M., FONDE'N, R., SAXELIN, M., COLLINS, D., MOGENSEN, G., BIRKELAND, S. E., SANDHOLM, T. M. Demonstration of safety of probiotics - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 93-106, 1998.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**, 3. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjuvante dietético**. In: Ciência e Tecnologia de Alimentos, pp. 69. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SHAHVERDI, A. R., RAFII, R., FAZELI, M. R., JAMALIFAR, H. Enhancement of antimicrobial activity of furazolidone and nitrofurantoin against clinical isolates of Enterobacteriaceae by piperitone. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, p. 77-80, 2004.

STANTON, C., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., SINDEREN, D. V. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198-203, 2005.

STRATTON, C. W. Cloranfenicol. **Antimicrobics and diseases newsletter**, v. 18, p. 89-91, 2002.

STRØMAN, P., MÜLLER, C. C., SØRENSEN, K. I. Heat shock treatment increases the frequency of loss of an erythromycin resistance-encoding transposable element from the chromosome of *Lactobacillus crispatus*

CHCC3692. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7173-7180, 2003.

SULLIVAN, A., EDLUND, C., NORD, C. E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 101-114, 2001.

TALWALKAR, A., KAILASAPATHY, K. Metabolic and Biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. **Journal Dairy Sciences**, v. 86, p. 2537-2546, 2003.

TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G., SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 1-10, 2003.

**THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemical, drugs and biologicals.** 13 ed. White House Station, N.J: Merck, 1996.

TUOMOLA, E., CRITTENDEN, R., PLAYNE, M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 393-398, 2001.

UETANABARO, A. P. T. **Sequência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** In: Microbiologia Agrícola, pp. 60. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999.

VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., EHRLICH, S. D., MAGÍN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 187-216, 2002.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance.** Washington, D.C. ASM PRESS. p. 335, 2003.

WANG, Y. C., YU, R. C., CHOU, C. C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 23, p. 128-135, 2006.

WRIGHT, G. D. Mechanism of resistance to antibiotics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 563-569, 2003.

ZHOU, J. S., PILLIDGE, C. J., GOPAL, P. K., GILL, H. S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 211-217, 2005.