

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**OCORRÊNCIA DE BACTERIOCINAS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Zymomonas mobilis*.**

Gláucia Manoella de Souza Lima

RECIFE - 2002

Gláucia Manoella de Souza Lima

**OCORRÊNCIA DE BACTERIOCINAS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Zymomonas mobilis*.**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia de Produtos
bioativos para obtenção do grau
de mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadoras: Profa.Dra.Janete Magali de Araújo
Profa.Dra Yoko Bomura Rosato

RECIFE, 2002.

DEDICO

Aos meus pais, Gláucio e Graça, e as minhas irmãs, Gleicy e Gláubia, pelo apoio e incentivo que sempre me deram para o aperfeiçoamento da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Janete Magali de Araújo e a Prof^a Dr^a Yoko Bomura Rosato pela orientação, dedicação e amizade colaborando no desenvolvimento deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Glauce Brennand pela amizade e estímulo neste caminho que percorremos.

A Prof^a Dr^a Neiva Tinti de Oliveira do Departamento de Micologia da UFPE pela disponibilidade e contribuição no fornecimento dos primers.

A todos os professores do mestrado, em especial a Prof^a Dr^a Glícia Maria Torres Calazans por todo apoio e amizade dispensados.

Aos colegas do mestrado, especialmente a Jefferson, Leila e Ivanilda pela ajuda e paciência no decorrer deste trabalho.

A amiga Patrícia Sobral pela disponibilidade e pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

Aos amigos do laboratório Orlando, Clécia, Fátima, Gerson, Manuel, Zeca, Carlos Alberto, Cíntia, Daniele, Luciane, Márcio Luís, Paulo, Rita, Sérgio e Tatiana pelo carinho e amizade que sempre dedicaram.

As secretárias do curso Sueli e Patrícia pela ajuda constante.

A bibliotecária Glória Alencastro e a estagiária Sílvia pela presteza com que atendeu aos pedidos dos artigos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo necessária para realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 ESQUEMA DO TESTE DE ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA PELO MÉTODO DO ANTAGONISMO DIRETO COM LINHAGENS DE *Z. MOBILIS* NO MEIO SCHREDER A 30°C.....29
- FIGURA 2 .DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (MM) PRODUZIDOS POR DIFERENTES LINHAGENS DE *Z. MOBILIS*, UTILIZANDO *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *STREPTOCOCCUS FAECALIS* E DIFERENTES LINHAGENS DE *E. COLI*, COMO LINHAGENS INDICADORAS.....38
- FIGURA 3 DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (MM) PRODUZIDO POR LINHAGENS DE *Z. MOBILIS* NOS MEIOS SSDL (A) E SCHREDER (B) A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO *E. COLI* K12 COMO LINHAGEM INDICADORA.40
- FIGURA 4 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA BACTERIOCINA PRODUZIDA PELA LINHAGEM Z1-86B CONTRA *E. COLI* K12 NOS MEIOS SCHREDER (A) E SSDL (B).41
- FIGURA 5 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA BACTERIOCINA PRODUZIDA PELA LINHAGEM Z1-87 CONTRA A *E. COLI* K12 NO MEIO SCHREDER.41
- FIGURA 6 ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA NO SOBRENADANTE DAS LINHAGENS DE *Z. MOBILIS*. 43
- FIGURA 7 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA PELA LINHAGEM *Z. MOBILIS* Z1-87, NO MEIO SCHREDER , A 37°C.45
- FIGURA 8 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS TOTAIS. NOS POÇOS ESTÃO: MARCADOR (M) E DE 1 A 6 ENCONTRAM-SE OS EXTRATOS DAS LINHAGENS DE *Z. MOBILIS*, CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.46

FIGURA 9 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA OBTIDOS COM OS PRIMERS OPQ-04 E OPR-01. NA ORDEM ESTÃO: M (MARCADOR 1Kb), M (100PB), NOS POÇOS DE 1 A 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.....	49
FIGURA 10 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDOS COM O PRIMER OPR-04. NA ORDEM ESTÃO: M (MARCADOR 1Kb), M (100PB), NOS POÇOS DE 1 A 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.....	49
FIGURA 11 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA AMPLIFICAÇÃO DO DNA OBTIDOS COM OS PRIMERS OPA-8, OPA-9 E OPX-17. NOS POÇOS ESTÃO: M (MARCADOR 1Kb), NOS POÇOS DE 1 A 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.	50
FIGURA 12 DENDOGRAMA CONSTRUÍDO A PARTIR DOS PERFIS DE RAPD OBTIDOS DAS 6 LINHAGENS DE <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i> , UTILIZANDO-SE O MÉTODO UPGMA-SJ.	50
FIGURA 13 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA OBTIDOS COM OS PRIMERS ERIC E REP, RESPECTIVAMENTE. NOS POÇOS ESTÃO: M (MARCADOR 1Kb), NOS POÇOS DE 1 A 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.....	53
FIGURA 14 DENDOGRAMA CONSTRUÍDO A PARTIR DOS PERFIS DE REP-PCR OBTIDOS DAS LINHAGENS DE <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i> , UTILIZANDO-SE O MÉTODO UPGMA, COEFICIENTE SJ.	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. LINHAGENS DE <i>Z. MOBILIS</i> UTILIZADAS.....	22
TABELA 2. BACTÉRIAS UTILIZADAS PARA OS TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS LINHAGENS DE <i>Z.MOBILIS</i>	22
TABELA 3. COMPONENTES DO MIX DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS DE <i>Z. MOBILIS</i> UTILIZANDO A REAÇÃO DE RAPD E REP-PCR.....	34
TABELA 4. PRIMERS SELECIONADOS PARA UTILIZAÇÃO NA REAÇÃO DE RAPD.	47
TABELA 5 PRIMERS SELECIONADOS PARA UTILIZAÇÃO NA REAÇÃO DE REP-PCR.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	- Ágar Nutriente
DAUFPE	- Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Dinucleotídeo trifosfatado
g	- Gramas
µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
MM	- Marcelo Magalhães
PAGE	- Polyacrilamide Gel Electrophoresis
PCR	- Reação de Polimerase em cadeia do inglês Polymerase Chain Reaction
pH	- Potencial Hidrogeniônico
RAPD	- Amplificação de DNA ao acaso do inglês Random Amplified Polymorphic DNA
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio do inglês Sodium Dodecyl Sulfate
SSDL	- Standard SWINGS & DE LEY
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
v/v	- volume/volume
kb	- Kilobase
kDa	- Kilodalton

RESUMO

O fermentado de *Zymomonas mobilis* tem apresentado diversas aplicações terapêuticas contra várias infecções bacterianas. Diante desse fato, o presente trabalho teve como objetivo relacionar a ação terapêutica de *Z. mobilis* com a produção de bacteriocina além de caracterizar as linhagens através de SDS-PAGE, RAPD e rep-PCR. Para verificar a ocorrência de bacteriocina, foram testadas 6 linhagens de *Zymomonas mobilis* (CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 e Z2-88) contra as linhagens *Escherichia coli* K12, *E. coli* BH57, *E. coli* ATCC 9637, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Os resultados obtidos mostram que todas as linhagens de *Zymomonas* produzem bacteriocina, exibindo um amplo espectro de ação. Os perfis de atividade antimicrobiana mostraram diferenças significativas em relação ao heteroantagonismo. Foi avaliada também a influência do meio de cultura (SSDL e Schreder) e temperatura (30°C e 37°C) na expressão da atividade antagonista produzida pela *Z. mobilis*. Os dois meios foram eficientes para produção de bacteriocina, porém foi observada melhor atividade bacteriocinogênica para a linhagem Z1-87 no meio Schreder a 37°C. As bacteriocinas permaneceram estáveis até 80°C por 15 minutos e foram inativadas pela proteinase K. Não foram observados bacteriófagos e ácidos atuando como prováveis inibidores de crescimento. A cinética da produção de bacteriocina da linhagem Z1-87 no meio Schreder revelou que a produção iniciou na fase logarítmica e se estabilizou na fase estacionária. A análise eletroforética de proteínas totais não foi eficaz para a caracterização genética das linhagens de *Z. mobilis*. Com a técnica de RAPD foram selecionados sete primers os quais originaram 47 bandas, sendo possível evidenciar o polimorfismo entre as linhagens. O rep-PCR foi bastante sensível para detectar diferenças genéticas entre as linhagens, utilizando os primers ERIC e REP. As linhagens apresentaram um nível de similaridade em torno de 62%.

ABSTRACT

The fermented broth of the Gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis* has shown several therapeutic applications against bacterial infections. Analyzing the production of inhibitory compounds by six strains of *Z. mobilis* the possibility of the bacteriocin involvement in this therapy was tested. The strains were also characterized by electrophoresis of whole cell proteins (SDS-PAGE) and two PCR based approaches using six arbitrary primers (RAPD) and two rep primers (REP and ERIC). All *Z. mobilis* strains used (CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 and Z2-88) displayed a wide inhibitory spectrum of action against some Gram-negative and Gram-positive bacterial strains (*E. coli* K12, *E. coli* BH57, *E. coli* ATCC 9637, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*). Two culture media (SSDL and Schreder) and temperature of 30° C and 37° C were effective in the expression of the inhibitory activity and a slight higher production was shown by strain Z1-87 in Schreder medium at 37° C. No bacteriophages or acid compounds were involved in the inhibitory activity. Bacteriocins remained stable after 15 minutes of incubation at 80° C and were inactivated by proteinase K. The kinetics of the bacteriocin production during the growth phase revealed that the compound began the production during the late logarithmic phase and maintained during the stationary phase. The fingerprinting pattern of the producer strains showed no polymorphism employing the SDS-PAGE technique however using both RAPD and rep-PCR the differentiation of the six strains, in different degrees of similarity, was found.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
 LISTA DE TABELAS
 LISTA DE ABREVIATURAS
 RESUMO
 ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i>	8
3.1.1 <i>Genética de Z.mobilis</i>	9
3.1.2 <i>Atividade Antagonista</i>	11
3.2 BACTERIOCINA.....	12
3.2.1 <i>Condições para detecção de bacteriocina</i>	14
3.2.3 <i>Mecanismo de Ação</i>	15
3.2.4 <i>Genética de bacteriocina</i>	16
3.2.5 <i>Aplicação da bacteriocina</i>	18
3.3 MARCADORES BASEADOS EM PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 MICRORGANISMOS.....	22
4.2 MEIOS DE CULTIVO:.....	23
4.2.1 <i>Manutenção das linhagens de Z. mobilis</i>	23
4.2.2 <i>Meios de cultura utilizados nos experimentos</i>	23
4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	24
4.4 ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA.....	28
4.4.1 <i>Avaliação do meio de cultura e temperatura de incubação na produção de bacteriocina por Z. mobilis</i>	28
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTERIOCINAS.....	30
4.5.1 <i>Avaliação da presença de bacteriófagos</i>	30
4.5.2 <i>Ocorrência de bacteriocina no sobrenadante</i>	30
4.5.3 <i>Determinação da estabilidade da bacteriocina</i>	31
4.5.4 <i>Avaliação da natureza protéica</i>	31
4.6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA.....	31
4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	32
4.7.1 <i>Análise de proteínas totais (SDS-PAGE)</i>	32
4.7.2 <i>Extração do DNA total</i>	32
4.7.3 <i>Condições de amplificação (RAPD e rep-PCR)</i>	33
4.7.4 <i>Reação de rep-PCR</i>	34
4.8 ANÁLISE DOS DADOS.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5.1. ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA	37
5.1.1 <i>Avaliação do meio de cultura e temperatura de incubação.</i>	39
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTERIOCINAS.	42
5.3 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA	45
5.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS BACTERIOCINOGÊNICAS DE <i>Z. MOBILIS</i>	46
5.4.1 <i>SDS-PAGE</i>	46
5.4.2 <i>Quantificação do DNA.</i>	47
5.4.3 <i>RAPD</i>	47
5.4.4 <i>rep-PCR</i>	51
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. ANEXOS.....	71

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, tem feito parte da história o uso de microrganismos com a finalidade de se obter produtos naturais para o tratamento de infecções, beneficiando e melhorando o estilo de vida do homem (FULLER, 1988; FULLER & GIBSON, 1997). O “aguamiel” (seiva fermentada naturalmente por *Zymomonas mobilis*) foi muito utilizado pelos astecas na prevenção e no tratamento de infecções intestinais, ainda quando não se conhecia o efeito benéfico dos microrganismos (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970). Em 1911, a bactéria *Z. mobilis* foi isolada por Barker & Hillier de uma microflora de sidra fermentada e, posteriormente, a partir de uma bebida derivada do agave (LINDNER, 1926).

Logo após o isolamento da bactéria *Z. mobilis*, LINDNER (1932), estudando as propriedades antagonistas dessa bactéria verificou, após ingerir o filtrado, ótimos resultados quando o mesmo era utilizado no tratamento de certas infecções entéricas.

Desde a década de 50, vem sendo constatada, no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, a atividade antagonista da mesma em infecções entéricas causadas por *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (GONÇALVES DE LIMA et al., 1968). A partir desses resultados, foi sugerido o uso do seu fermentado como agente terapêutico contra várias infecções como enterocolite e cistite, sendo obtida regressão dos sintomas em todos os casos (PAULA GOMES, 1959).

A ação antagonista dessa bactéria atinge grande número de leveduras e fungos filamentosos, apresentando também atividade contra protozoários como *Trichomonas vaginalis*.

Apesar do amplo conhecimento da atividade antagonista de *Z. mobilis*, não foi ainda elucidado o seu mecanismo de ação. Pode-se levantar como uma forma de atuação a secreção de bacteriocinas, proteínas que têm ação inibitória ou destrutiva contra determinadas bactérias. A produção de bacteriocinas tem sido observada em muitas outras bactérias Gram-negativas. Além das bacteriocinas, muitas bactérias são capazes de produzir uma variedade de outras substâncias que apresentam atividade antagonista, entre as quais estão os antibióticos, agentes líticos, enzimas e bacteriófagos (TAGG et al., 1976; JABRANE et al., 1994; JACK et al., 1995).

Segundo critérios clássicos, as bacteriocinas são substâncias de natureza protéica, com pequeno espectro de ação centrado nas espécies relacionadas, ligando-se a receptores celulares específicos, sendo a célula hospedeira considerada imune. Os determinantes genéticos que codificam sua produção, geralmente, são de natureza plasmidial (TAGG et al., 1976; JACK et al., 1995).

A mais estudada de todas as bacteriocinas por microrganismos Gram-negativos é a colicina, produzida pela bactéria *E. coli*. Entretanto, a ocorrência dessas substâncias nos microrganismos anaeróbios ainda é escassa, restringindo-se a alguns gêneros, tais como: *Bacteroides* (BOOTH et al., 1977; MOOSIE et al., 1979; SOUTHERN et al., 1984; FARIAS et al., 1992; MIRANDA et al., 1993; FARIAS et al., 1994), *Fusobacterium* (OLIVEIRA et al., 1998), *Prevotella* (TAKADA et al., 1991; TEANPAISAN et al., 1998) e *Clostridium* (HIGA et al., 1991). Quanto ao gênero *Zymomonas*, pouco se sabe sobre a produção desse composto, tendo sido encontrado na literatura apenas um resumo (TAN & ROGERS, 2000).

A determinação da ocorrência de bacteriocina em *Z. mobilis* responderá a questões relacionadas com a ação terapêutica desta bactéria, uma vez que, desde 1959, foi comprovado, e vários trabalhos mostram que *Zymomonas* atua inibindo várias bactérias Gram-negativas.

O Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE) possui uma coleção de linhagens de *Z. mobilis*, cujo início data de 1952. As informações referentes à formação da coleção e o histórico das linhagens isoladas foram descritas por FALCÃO DE MORAIS et al. (1993). Algumas dessas linhagens foram caracterizadas quanto ao perfil plasmidial (DALLY et al., 1982; YABLONSKY et al., 1988), entretanto, uma caracterização molecular mais detalhada ainda não foi efetuada.

Os estudos de caracterização molecular de bactérias têm sido realizados através do uso de diversas técnicas que investigam as características fenotípicas incluindo perfis de proteínas, enzimas, sorologia, lipídios, etc. Devido aos avanços das técnicas na área genética, nos anos recentes uma ênfase especial tem sido dada à análise genômica do DNA, que procura detectar regiões polimórficas. Nesse caso, a maioria dos métodos utilizados compreende a aplicação de PCR (polymerase chain reaction) empregando-se primers arbitrários, RAPD (random amplification of polymorphic DNA) ou primers com

seqüências repetitivas, rep – PCR (ERIC, BOX e REP) (WELSH & MCCLELLAND, 1990; LOUWS et al., 1999).

Este trabalho descreve a ocorrência de bacteriocina em diferentes linhagens de *Z. mobilis* que foram capazes de inibir diferentes linhagens de *Escherichia coli*, patogênicas e não patogênicas, de *Salmonella* e *Staphylococcus*. Foi também efetuada a caracterização das linhagens produtoras de bacteriocina assim como verificado o grau de similaridade entre elas utilizando-se o perfil de proteínas celulares solúveis (SDS-PAGE) e perfis de amplificação do genoma com primers arbitrários (RAPD) e repetitivos (rep-PCR).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Detecção da ação inibitória de diferentes linhagens de *Z. mobilis* contra *E. coli* e outras bactérias patogênicas e caracterização molecular das linhagens de *Z. mobilis*.

2.2 Objetivos Específicos:

- Detecção da ocorrência de bacteriocina e o perfil de atividade nas linhagens de *Z. mobilis*;
- Cinética da produção de bacteriocina;
- Caracterização da bacteriocina;
- Caracterização molecular das linhagens produtoras de bacteriocina através de SDS-PAGE, RAPD e rep-PCR.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, pertencentes ao subgrupo α das proteobactérias. Apresentam-se na forma de bastonetes curtos e grossos, isolados ou aos pares, geralmente móveis com 1 a 4 flagelos. Muitas linhagens são tolerantes ao álcool e crescem em meio com glicose acima de 25% (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970, SWINGS & DE LEY, 1977, KANG & KANG, 1998).

Barker & Hillier, em 1911, foram os primeiros a isolar *Z. mobilis* como causadora da chamada “doença da sidra”. Eles descreveram essa bactéria como sendo a responsável pela mudança do sabor típico e do aroma da sidra (SWINGS & DE LEY, 1977).

Contudo a descoberta de *Z. mobilis* foi atribuída a Lindner, em 1924, durante a fermentação do agave mexicano, “Aguamiel”, usado para a produção da bebida alcoólica, o pulque. Inicialmente, essa bactéria foi denominada como *Termobacterium mobile*. Posteriormente, Kluver & Hoppenbrouwers, em 1931, estudaram a bioquímica dessa bactéria e a denominaram *Pseudomonas lindneri*. Mais tarde, em 1936, Kluver & Van Niel a reclassificaram como sendo *Zymomonas mobilis* (SWINGS & DE LEY, 1977).

A partir do caldo de cana fermentado (caldo-de-cana picado), Gonçalves de Lima isolou diversas linhagens de *Z. mobilis* no Recife (nordeste brasileiro), que através de estudos taxonômicos foi denominada de *Z. mobilis* variedade *recifensis* (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970).

Essa bactéria vem despertando muito interesse por ser um agente potencial na produção de etanol, produzindo cerca de 1.8 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae* (ROGERS et al., 1979; BARROW et al., 1984; GLAZER & NIKAIDO, 1995). A bactéria fermenta apenas três açúcares (glicose, frutose e sacarose) pela via Entner-Doudoroff e converte cerca de 95% de glicose e frutose em etanol. Entretanto, quando cresce em meio com sacarose ocorre a formação de levana, reduzindo significativamente a formação de etanol (SWINGS & DE LEY, 1977; BARROW et al., 1984; SPRENGER, 1996). BARROW et al. (1984)

relataram que todas as linhagens de *Z. mobilis* quando cultivadas em meio com frutose e glicose produzem sorbitol; entretanto, algumas linhagens com alta produção de etanol produzem baixa quantidade de sorbitol quando em presença de sacarose.

3.1.1 Genética de *Z.mobilis*

Atualmente, muitos avanços vêm sendo obtidos na genética de *Z. mobilis* com o emprego de técnicas da biologia molecular, as quais podem ser utilizadas para as mais diversas aplicações, visando estudos de biodiversidade bem como das principais enzimas envolvidas na utilização de açúcares (WEISSER et al., 1996; DEANDA et al., 1996; KYONO et al., 1995; YANASE et al., 1991) e produção de levana (KYONO et al., 1995).

Z. mobilis sempre despertou grande interesse dos biotecnologistas pela importância dos seus produtos e atualmente os biólogos moleculares vêem nesta bactéria um modelo para transferência de plasmídios e manipulações genéticas (DALLY et al., 1982; YANASE et al., 1991; KYONO et al., 1995; STEINER et al., 1998; ANANTHALAKSHMY & GUNASEKARAN, 1999).

Essa bactéria apresenta conteúdo de guanina e citosina (G+C) em torno de 48%, o tamanho do genoma foi determinado por SWINGS & DE LEY (1977) como sendo de aproximadamente 2.300 Kb. Posteriormente, KANG & KANG (1998) determinaram através da análise de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), que o genoma de *Z. mobilis* é menor que o relatado por Swings & De Ley (1977), apresentando um tamanho de 2085,5 Kb.

Alguns trabalhos relatam a ocorrência de plasmídios em linhagens de *Z. mobilis* variando o número e o tamanho dos mesmos dependendo da metodologia de extração utilizada (DALLY et al., 1982; YABLONSKY et al., 1988).

TONOMURA et al. (1982) foram os primeiros que relataram a ocorrência de plasmídios, possibilitando a comparação e a caracterização destes elementos extracromossômicos em diferentes linhagens. Todas as linhagens de *Z. mobilis* apresentaram plasmídios variando de 1.76 a 50 Kb.

DALLY et al. (1982), examinaram as relações genéticas entre as linhagens de *Z. mobilis* (ATCC 10988, ATCC 29192, Ag11, CP3 e CP4) pela habilidade de atuar como

receptoras de plasmídios e pelo perfil plasmidial dessas espécies. Os autores observaram que as linhagens CP3 e CP4, isoladas por GONÇALVES DE LIMA et al. (1970), apresentaram maior eficiência como receptoras de plasmídios e que ambas apresentavam perfis plasmidiais idênticos.

Igualmente, YABLONSKY et al. (1988) estudaram o perfil plasmidial de linhagens de *Z. mobilis* CP4, de várias procedências, e estas foram divididas em dois grupos (I e II) de acordo com o conteúdo plasmidial das linhagens analisadas. No grupo I, a linhagem *Z. mobilis* CP4 (Recife) apresentou quatro plasmídios de peso molecular que variaram de 31.5 a 35 Kb, enquanto a mesma linhagem, procedente da Escócia, Universidade de New South Wales foi denominada ZM4 (grupo II), apresentou apenas três plasmídios com peso molecular variando de 32,5 a 40 Kb, indicando a perda espontânea de plasmídios.

Muitos genes e operons de linhagens de *Z. mobilis* já foram seqüenciados por diversos grupos. Entre esses estão genes da frutoquinase (ZEMBRZUSKI et al., 1992), piruvatoquinase (STEINER et al., 1998) e genes do metabolismo da sacarose (SONG et al., 1993, 1994; ANANTHALAKSHMY & GUNASEKARAN, 1999).

Estudos sobre o metabolismo da sacarose em *Z. mobilis* têm revelado a presença de três tipos de enzimas que hidrolisam a sacarose: a levanasacarase extracelular, LevU- que forma a levana e glicose; a invertase extracelular, InvB – que forma glicose e frutose, e a invertase A, InvA, cuja função ainda não está muito clara (O'MULLAN et al., 1991; YANASE et al., 1992; SONG et al., 1993; GUNASEKARAN et al., 1995).

A LevU e *invB* (também conhecidas como SacB e SacC) apresentam alto grau de similaridade na seqüência de aminoácidos e os seus genes estão agrupados no cromossomo e provavelmente os dois genes têm a mesma origem (SONG et al., 1993; GUNASEKARAN et al., 1995).

YANASE et al. (1992), clonaram e seqüenciaram o gene da invertase extracelular (*invA*) e ao compararem a seqüência de aminoácidos dessa enzima encontraram um alto grau de homologia com as enzimas *invA* de *E.coli*, *Bacillus* e *Saccharomyces cerevisiae*, apresentando peso molecular de 58,728.

Os genes da levanasacarase extracelular e a invertase intracelular foram clonados, seqüenciados e caracterizados por KYONO et al. (1995), os quais verificaram a similaridade das seqüências desses genes a nível de aminoácidos de 65,3% e a nível de nucleotídeo de 68,1%.

3.1.2 Atividade Antagonista

As propriedades medicinais e o antagonismo competitivo da bactéria *Z. mobilis* sobre bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido relatados em diversos trabalhos (GONÇALVES DE LIMA et al., 1968; WANICK et al., 1970; GONÇALVES DE LIMA et al., 1970; SOUZA & SOUZA, 1973; LOPES et al., 1980; SCHUMACHER et al., 1997; FERRAZ et al., 1998).

Maurizio (1931) *apud* GONÇALVES DE LIMA et al. (1972) já citava o sucesso dessa bactéria nas clínicas de Viena no tratamento da dispepsia putrefativa e enfermidades relacionadas, demonstrando a capacidade da mesma em modificar a flora intestinal, não permitindo o surgimento de bactérias patogênicas.

Em 1939, LINDNER *apud* GONÇALVES DE LIMA et al. (1958), relatou a ação da bactéria *Z. mobilis* no tratamento da brucelose no homem e nos animais, em distúrbios intestinais e em furúnculos.

Foram muitos os médicos no Recife que, motivados pelas propriedades medicinais de *Z. mobilis*, reportadas por diversos pesquisadores, começaram a tratar com o fermentado dessa bactéria pacientes que apresentavam infecções diversas ocasionadas por microrganismos resistentes (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993).

PAULA GOMES (1959), tratou pacientes com cistites e enterocolites crônicas com o fermentado de *Z. mobilis* e obteve regressão dos sintomas em todos os casos.

GONÇALVES DE LIMA et al (1968), demonstraram a ação antagonista de *Z. mobilis* contra várias espécies de bactérias e fungos através dos testes *in vitro* de estrias cruzadas.

WANICK et al. (1970), utilizando tampões vaginais impregnados de cultura de *Z. mobilis*, trataram pacientes com vaginites causadas por *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Neisseria gonorrhoea*. Estes resultados motivaram WANICK et al. (1971a) a utilizarem o cultivo de *Z. mobilis* sob a forma de geléia nos pacientes portadores de infecções ginecológicas causadas pelos microrganismos acima citados.

SOUZA & SOUZA (1973) trataram 95 pacientes portadores de colpites e vulvovaginites, onde 86,3% dos pacientes obtiveram cura.

LOPES et al. (1980) empregaram a cultura líquida de *Z. mobilis* no tratamento de pacientes com infecções entéricas causadas por diversas bactérias, entre elas *Proteus morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, obtendo, ao final do tratamento, o desaparecimento dos sintomas clínicos.

CALAZANS (1997), estudou a atividade antitumoral da levana produzida por diferentes linhagens de *Z. mobilis*, em camundongos com sarcoma 180 e carcinoma de *Erlisch*. Onde verificou que essa atividade antitumoral varia em relação ao peso molecular da levana. Resultados semelhantes foram obtidos por LIMA (2001), que também observou a influência do peso molecular do polissacarídeo na resposta antitumoral.

FERRAZ et al. (1998), analisaram a influência do fermentado de *Z. mobilis* em camundongos induzidos a desenvolver uma peritonite por ligadura e punctura cecal, e comprovaram uma diminuição da taxa de mortalidade de 33% para o grupo tratado, enquanto no grupo controle a taxa de mortalidade foi cerca de 60%.

SANTOS et al. (2001) avaliaram a ação antihelmíntica da cultura bacteriana de *Z. mobilis* tratando camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e obtiveram uma redução significativa de 60,91% no grupo tratado quando comparado com o controle, cujos camundongos não haviam tomado o fermentado.

3.2 Bacteriocina

No século passado, Pasteur & Joubert foram os primeiros a estudar as interações antagonísticas entre diferentes bactérias, pela demonstração do efeito inibitório de bactérias da urina sobre o *Bacillus anthracis*. Porém os cientistas da época se preocuparam mais com as implicações biológicas da interação bacteriana do que com a caracterização química do agente inibitório (TAGG et al., 1976).

O primeiro relato de substâncias inibitórias produzidas por *E. coli* foi feito por Gratia (1925), que observou que uma amostra virulenta de *E. coli* produzia, em meio líquido, uma substância dializável e termoestável capaz de inibir o crescimento de *E. coli*. Essa substância a princípio foi denominada de princípio V. Mais tarde, GRATIA (1932) estabeleceu a natureza protéica desse componente, e observou também que outras amostras de *E. coli* produziam substâncias similares (TAGG et al., 1976; JACK et al.,

1995). Foi em 1946 que FREDERICQ resolveu adotar um termo que englobasse todas essas substâncias inibitórias produzidas pela família *Enterobacteriaceae*. (TAGG et al., 1976; JACK et al., 1995). Com a descoberta da produção dessas proteínas antibacterianas por outras bactérias não coliformes, JACOB et al. (1953) resolveram denominá-las de bacteriocinas.

Segundo TAGG et al. (1976), as bacteriocinas são substâncias de natureza protéica que possuem pequeno espectro de ação centrado em espécies relacionadas, têm ação bactericida, elevado peso molecular, ligam-se a receptores celulares específicos e os determinantes genéticos que codificam sua produção são, geralmente, de natureza plasmidial. Os plasmídios portadores desses genes podem determinar não somente a composição química destas substâncias como também a regulação da biossíntese e autoimunidade, podendo ser transferidos por conjugação, transformação ou transdução.

Para classificar uma substância como sendo bacteriocina, alguns critérios devem ser preenchidos. Por definição, todas as bacteriocinas contêm componentes protéicos ou peptídicos que são essenciais para suas funções. Alguns trabalhos relatam que essas substâncias consistem da combinação de diferentes proteínas ou são compostos de proteínas que podem estar complexadas a carboidratos e ou lipídios, mas estudos demonstram que a parte responsável pela atividade antagonista situa-se na porção carboxiterminal da proteína (VAN BELKUM et al., 1991; LEWUS et al., 1992; NISSENMEYER et al., 1993; JIMENEZ-DIAZ et al., 1993; ALLISON & KLAENHAMMER, 1994; DAW & FALKINER, 1996). Geralmente, são encontradas como polipeptídios de alto peso molecular, como as colicinas, que variam de 29 a 90 kDa (PUGSLEY, 1984; BRAUN et al., 1994; JACK et al., 1995). Em outros casos, apresentam um peso molecular de apenas 6 kDa, sendo chamada de microcina (KOLTER & MORENO, 1992).

As bacteriocinas foram primeiramente caracterizadas em *E. coli*, sendo as colicinas as mais estudadas (JACK et al., 1995). Desde a sua descoberta vem servindo de modelo para o desenvolvimento de métodos de detecção e estudos de estrutura, modo de ação, imunidade, genética e aplicação (REEVES, 1965; NOMURA, 1967; TAGG et al., 1976; LEWUS et al., 1991).

A partir da década de 90, as bacteriocinas começaram também a ser estudadas em bactérias Gram-positivas como, por exemplo, as produtoras de ácido láctico devido à grande importância econômica na indústria alimentícia (JACK et al., 1995). Diferentes

gêneros como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* foram incluídos como produtores de bacteriocinas (ALLISON & KLAENHAMMER, 1999).

CLEVELAND et al. (2001), enfatizaram que, além da aplicação das bactérias lácticas como probióticos, as bacteriocinas também são muito utilizadas na conservação de alimentos, sendo a nisina a única produzida comercialmente para a conservação de alimentos, legalizada em 1988 nos Estados Unidos quanto a segurança como GRAS, Generally Regarded as Safe. Esta bacteriocina é classificada como um lantibiótico, por conter o aminoácido lantionina, com capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes* (STEVENS et al., 1991; CLEVELAND et al., 2001).

3.2.1 Condições para detecção de bacteriocina

A produção de substâncias tipo bacteriocinas pode ser demonstrada em meio sólido, líquido e semi-sólido através da inibição do microrganismo sensível (GANGLIANO & HINDSDILL, 1970; BOTTONNE et al., 1971; TAGG et al., 1976).

Os métodos mais utilizados são antagonismo direto ou sobrecamada, difusão em poços ou em discos de papel e pelo método de estrias cruzadas, igualmente como os ensaios para atividade antibiótica. No antagonismo direto a linhagem produtora de bacteriocina é inoculada em meio de cultura sólido, incubada e em seguida colocada uma sobrecamada semi-sólida pré-inoculada com a linhagem indicadora. No método de difusão, o sobrenadante da linhagem produtora é adicionado nos discos de papel ou nos poços perfurados no meio de cultura sólido, previamente semeado com o microrganismo indicador. Já no método de estrias cruzadas a linhagem produtora é inoculada com alça no meio de cultura sólido e após crescimento o microrganismo indicador é inoculado, também por estria, perpendicularmente à linhagem produtora de bacteriocina (MAYR-HARTING et al., 1972; HOOVER & HARLANDER, 1993).

A literatura afirma que alguns fatores são muito importantes para a produção e detecção da bacteriocina, como os constituintes do meio de cultura e as condições de cultivo de organismos bacteriocinogênicos (TAGG et al., 1976; BISWAS et al., 1991). Variações nas condições de pH, temperatura e tempo podem interferir na produção de

bacteriocina. Geralmente, a produção de bacteriocina é muito boa na temperatura ótima para o crescimento da linhagem produtora. O crescimento a altas temperaturas pode suprimir a produção de bacteriocina e muitas vezes levar a uma perda irreversível da propriedade antagonista (DAJANI & TAUBE, 1974; JETTEN & VOGELS, 1973; TAGG et al, 1976; BISWAS et al.,1991).

LI et al. (2002) avaliaram os efeitos promovidos pelos componentes dos meios de cultura na produção de nisina e no crescimento celular, procurando o melhor componente que produzisse maiores quantidades de nisina. Os diferentes ingredientes do meio de cultura apresentaram diferentes efeitos no rendimento da bacteriocina e no crescimento celular. O meio de cultura que não era tão vantajoso para o crescimento celular era o que produzia uma alta concentração de nisina, comprovando que as condições ótimas para o crescimento celular não implicam na maior produção de bacteriocina.

A produção de muitas bacteriocinas pode ser induzida por tratamentos físicos ou químicos como a irradiação ultravioleta ou com mitomicina C (TAGG et al., 1976).

Todas as bacteriocinas contêm um componente protéico que é essencial para a sua atividade biológica. Conseqüentemente, os testes de sensibilidade com enzimas proteolíticas (proteínase, tripsina etc) são muito utilizados para determinar a natureza química da bacteriocina (TAGG et al., 1976; VAN BELKUM et al., 1991; LEWUS et al., 1992; NISSEN-MEYER et al., 1992; JIMENEZ-DIAZ et al., 1993; ALLISON & KLAENHAMMER, 1994).

3.2.3 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode variar conforme o microrganismo produtor utilizado. Segundo TAGG et al. (1976) o conhecimento do mecanismo de ação deriva de estudos realizados com colicinas, podendo ser dividido em três etapas:

- A primeira etapa consiste na ligação da bacteriocina a receptores específicos no envelope celular, que ocorre, provavelmente, de forma reversível. .Esses receptores geralmente têm funções como: ligações a vitaminas ou fatores de crescimento;

- Na segunda etapa ocorre o transporte das moléculas de bacteriocina através da membrana externa e, em alguns casos, via membrana citoplasmática;
- A última etapa envolve a morte celular via lesões bioquímicas específicas

O mecanismo de ação é característico para cada tipo de bacteriocina, mas, em geral, o principal mecanismo é a alteração da permeabilidade celular ou inibição da síntese do DNA, RNA e outras macromoléculas (HAMMOND et al., 1987; BHUNIA et al., 1991; AZEVEDO, 1998).

O espectro de atividade de uma bacteriocina é determinado em parte pela presença de receptores apropriados nos organismos suscetíveis. Tem sido observado que as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas demonstram atividade contra várias espécies de bactérias Gram-positivas, enquanto as bactérias Gram-negativas atuam sobre espécies relacionadas (TAGG et al., 1976; JACK et al., 1995). Porém, são encontradas algumas espécies de bactérias Gram-negativas que apresentam amplo espectro de atividade, como as bactérias da cavidade oral, *Actinomyces actinomycetemcomitans* e espécies de *Bacteroides* orais que produzem bacteriocinas contra espécies de *Bacteroides*, *Streptococcus* e *Actinomyces*. Enquanto várias espécies de *Pseudomonas* apresentam atividade contra *Micrococcus* (NAKAMURA et al., 1981, HAMMOND et al., 1987; MIRANDA, 1993).

3.2.4 Genética de bacteriocina

Os genes bacteriocinogênicos podem determinar não somente a composição química da bacteriocina, mas também a regulação da biossíntese, liberação e imunidade da célula hospedeira. Muitas destas características genéticas estão relacionadas a plasmídios, com algumas exceções como piocina, subtilina e pneumococina, que estão localizados nos cromossomos. Em alguns casos os genes foram localizados em ambos, no plasmídio e no cromossomo (TAGG et al., 1976; KOLTER & MORENO, 1992; KLAENHAMMER, 1993; JACK et al., 1995; DAW & FALKINER, 1996; ALLISON & KLAENHAMMER, 1999).

Plasmídios que conferem a capacidade de produzir bacteriocina podem ser facilmente transferidos da linhagem bacteriocinogênica para outra linhagem compatível por conjugação ou transdução. Essa transferência tem sido bastante demonstrada para os plasmídios colicinogênicos (DAW & FALKINER, 1996). Em muitos casos um só plasmídio pode conter determinantes genéticos para diversas bacteriocinas, como é o caso do plasmídio p9B4-6 que codifica a lactococina A, B e M e também a proteína de imunidade.

Plasmídios de diferentes linhagens e subespécies podem codificar uma mesma bacteriocina, como por exemplo, a lactococina A que é produzida por duas subespécies diferentes de *Lactobacillus lactis* que apresentam plasmídios com peso molecular variando de 55 a 131 Kb. Por outro lado, duas ou mais bacteriocinas podem ser codificadas por diferentes plasmídios na mesma espécie (VANBELKUM et al., 1991; JACK et al., 1995).

Uma característica importante é a capacidade do microrganismo produtor de bacteriocina sobreviver à ação da sua própria bacteriocina através do mecanismo de imunidade específica, que consiste na produção de uma proteína imune (TAGG et al., 1976; JACK et al., 1995; ALLISON & KLAENHAMMER, 1999; CLEVELAND et al., 2001). Os genes responsáveis pela produção e imunidade de muitas bacteriocinas estão agrupados e organizados em um ou até dois operons e geralmente o gene que codifica a imunidade específica está muito próximo do gene de produção (KOLTER & MORENO, 1992; CLEVELAND et al., 2001).

Segundo ALLISON & KLAENHAMMER (1999) existem dois mecanismos principais de imunidade: o fator de imunidade pode interagir com o receptor da bacteriocina ou as bacteriocinas podem ser importadas e inativadas pela célula.

Antes de serem liberadas, as bacteriocinas são acumuladas no citoplasma onde serão transportadas na forma solúvel. Contudo, o transporte das bacteriocinas depende da expressão de um gene que codifica a proteína de liberação de bacteriocina (BRP), também chamada de proteína de lise (DAW & FALKINER, 1996).

Geralmente, o operon da bacteriocina codifica três proteínas: a bacteriocina, a proteína de imunidade e a proteína de lise. A proteína de imunidade tem a função de proteger a célula da ação letal da sua própria bacteriocina e a proteína de lise de auxiliar

na liberação da bacteriocina (JACK et al., 1995; DAW & FALKINER, 1996; CLEVELAND et al., 2001).

3.2.5 Aplicação da bacteriocina

A produção de bacteriocina tem despertado grande interesse no campo prático apresentando um grande significado na microbiologia médica, particularmente nos estudos epidemiológicos (DAW & FALKINER, 1996).

As bacteriocinas, especialmente de microrganismos Gram-positivos, têm sido amplamente utilizadas no controle de patógenos de alimentos (LEWUS et al., 1991; DAESCHEL, 1993; LEWUS & MONTVILLE, 1992; ALLISON & KLAENHAMMER, 1999). Também podem atuar como agentes terapêuticos, em infecções bacterianas de difícil controle e no controle biológico de bactérias fitopatogênicas (JACK et al., 1995; BIAGI & AZEVEDO, 1992, OLIVEIRA & ROSATO, 1996).

Atualmente, o uso abusivo de drogas antimicrobianas tem gerado o aparecimento de microrganismos resistentes a antibióticos; e a indústria farmacêutica não tem sido capaz de produzir de maneira rápida novos antibióticos efetivos contra esses microrganismos, que na sua grande maioria são multi-resistentes. Por isso, surgiu o interesse da implantação de bactérias produtoras de bacteriocinas que são capazes de interferir na colonização e infecção por espécies patogênicas (JACK et al., 1995).

Segundo TAKADA et al. (1991), doenças periodontais podem ser prevenidas, eliminando-se bactérias periodontopáticas da placa e do sulco gengival. O desenvolvimento de bacteriocina que iniba especificamente o crescimento de bactérias patogênicas poderia ser um método benéfico na regulação da microbiota oral. Eles observaram que a bacteriocina TH14 produzida pela *Prevotella intermedia* TH14 possui um pequeno espectro de ação, contudo afeta *P. intermedia* ATCC 25611 que está associada a doenças periodontais, evidenciando que essa bacteriocina é uma importante ferramenta para a prevenção de doenças periodontais.

3.3 Marcadores baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction).

O advento da biologia molecular tem provocado várias mudanças nos tipos de acessos utilizados para caracterização e identificação de bactérias fitopatogênicas, fungos e na pesquisa de doenças (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996; LOUWS et al., 1999).

Diversas técnicas estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores genéticos são utilizados para a detecção da variabilidade genética a nível de DNA, ou seja, para a detecção do polimorfismo, gerando informações sobre a diversidade genética.

De acordo com FARAH (1997), a técnica de PCR foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meios de um método simples e rápido de amplificação de seqüências, dispensando todas as trabalhosas técnicas de clonagem gênica. A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA, permitindo amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma.

WILLIAMS et al. (1990) desenvolveram uma nova classe de marcadores denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) baseado no princípio da técnica de PCR. Essa técnica tem sido bastante útil para estudos de ordem genética ou estudos que visam esclarecer problemas relacionados a taxonomia. Na técnica de RAPD é utilizado um primer de seqüência arbitrária a fim de se obter produtos de amplificação de diferentes isolados, espécies e gêneros. O tamanho dos primers utilizado em RAPD é menor, com seis a dez oligonucleotídeos, do que aqueles utilizados em reações de PCR específicas, justamente para aumentar a probabilidade de encontrar seqüências homólogas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996; HARRY et al., 2001).

Os marcadores RAPD são importantes ferramentas para verificar a variabilidade existente entre diferentes isolados dentro de uma mesma espécie, uma vez que geram um grande polimorfismo. A análise desses marcadores permite a elaboração de coeficientes de similaridade, que verificam o grau de relação genética entre os isolados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

O estudo da caracterização genética de isolados de *Z. mobilis*, por marcadores de RAPD, foi realizado por SILVA (2000) que comparou linhagens parentais (AG-11 e ZAP) e recombinantes (ZAG-4, ZAG-6, ZAG-10 e ZAG-12), evidenciando a eficiência dessa técnica em detectar o polimorfismo nas linhagens estudadas.

A caracterização genética tem também sido efetuada através de outros métodos baseados em PCR. Um outro marcador que vem sendo bastante utilizado para estudar a diversidade de organismos é o rep-PCR (repetitive DNA sequence).

A análise por rep-PCR foi desenvolvida baseada na ocorrência de seqüências conservadas repetitivas distribuídas no genoma de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O método permite a diferenciação a nível de espécies, subespécies e linhagens. Três pares de primers, BOX, ERIC e REP, permitem a amplificação de diversas regiões do genoma, gerando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e específicos para cada linhagem ou subespécie. O rep-PCR tem sido muito utilizado para detectar a diversidade genética de patógenos de plantas, animais e no ambiente (BRUIJN, 1992; LOUWS et al., 1994; 1999; GONÇALVES & ROSATO, 2000; METHA *et al.*, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizadas seis linhagens de *Zymomonas mobilis* (Tabela 1), pertencentes à coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, DAUFPE (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993).

As linhagens testadas quanto a sensibilidade à bacteriocina produzida por *Z. mobilis*. estão relacionadas na Tabela 02.

Tabela 1. Linhagens de *Z. mobilis* utilizadas

Linhagem	Origem	Local	Coleção (DAUFPE)
CP4	Caldo de cana Fermentado	Recife-PE	202
Z1-86A	Usina Maravilhas	Goiana-PE	353
Z1-86B	Usina Maravilhas	Goiana-PE	354
Z1-87	Engenho Alagoas	Alagoas	355
Z1-88	Usina Laranjeiras	Vicência-PE	356
Z2-88	Destilaria GIASA	Paraíba	357

Tabela 2. Bactérias utilizadas para os testes de atividade antimicrobiana das linhagens de *Z.mobilis*.

Linhagem	Registro (DAUFPE)
<i>E. coli</i> K12	84
<i>E. coli</i> BH57	393
<i>E. coli</i> ATCC 9637	476
<i>Salmonella enteritidis</i> MM	414
<i>Staphylococcus aureus</i> W	01
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 6057	138

4.2 Meios de Cultivo:

4.2.1 Manutenção das linhagens de *Z. mobilis*

O cultivo líquido das linhagens de *Z. mobilis* foi mantido em meio Standard de SWINGS & DE LEY, SSDL (SWINGS & DE LEY, 1977). Para estocagem a -20°C , a cultura crescida em SSDL foi adicionada na proporção de 1:2 em meio líquido SSDL estéril mais glicerol (20%). A temperatura de incubação foi de 30°C .

4.2.2 Meios de cultura utilizados nos experimentos

- SCHREDER - Ágar

Glicose	20g
Extrato de levedura	2g
K_2HPO_4	1g
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
ágar	15g
Água destilada	1000mL

- SSDL - Ágar

Glicose	20g
Extrato de levedura	5g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

- AN (Agar Nutritivo semi sólido)

Peptona	10g
Extrato de Carne	3g
NaCl	5g
Agar	7g
Água destilada	1000mL

Todos os meios foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

4.3 Soluções e Tampões

SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (10N)

NaOH	40g
Água destilada	100 mL

SOLUÇÃO DE GLICEROL 20% (v/v)

Glicerol	20 mL
Água deionizada q.s.p	80 mL

SOLUÇÃO DE NaCl 5M

NaCl	14,6 g
Água deionizada q.s.p	100 mL

SOLUÇÃO DE COOMASSIE BRILHANT BLUE

Coomassie brilliant blue R 250	0,15g
Ácido fosfórico	15 mL
Etanol 95%	7,5 mL

O volume foi completado com água deionizada para 150 mL.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE ACRILAMIDA-30% (p/v)

Acrilamida	75g
------------	-----

Bis-acrilamida	2g
Água deionizada q.s	250 mL

SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIO.

Persulfato de amônio	0,1g
Água deionizada .	1 mL

Obs: Esta solução deve ser preparada na hora do uso.

GEL EMPILHADOR- 4%

Tampão Tris-HCl 6,8	1,5 mL
Acrilamida (sol 30%p/v)	2 mL
Persulfato de amônio	0,112 mL
TEMED	0,015 mL
Água deionizada	11,4 mL
SDS 10%	0,2 mL

GEL SEPARADOR- 10%

Tampão Tris-HCl 8,9	2 mL
Acrilamida (sol 30%p/v)	6,7 mL
Persulfato de amônio	0,112 mL
TEMED	0,015 mL
Água deionizada	11,4 mL
SDS 10%	0,2 mL

FIXADOR PAGE

Metanol	45 mL
Ácido acético	10 mL
Água deionizada	45 mL

SOLUÇÃO CORANTE

Azul de Coomassie Brilliant Blue R250	50 mg
Fixador PAGE	50 mL

SOLUÇÃO DESCORANTE

Metanol	5 mL
Ácido acético	7 mL
Água deionizada	88 mL

SOLUÇÃO DE EDTA 0,5M (pH 8,0)

EDTA	9,3 g
NaOH	1 g
Água deionizada	40 mL

Obs:Após a completa dissolução dos componentes o volume foi completado para 50mL.

TAMPÃO Tris-HCl (pH 7,8)

Trizma base	1M
Água deionizada	60 mL

O pH foi ajustado para 7,8 com HCl e o volume completado para 100 mL.

TAMPÃO DA AMOSTRA PARA ELETROFORESE

Glicerol 20%	5 mL
Tampão do gel empilhador	2,5 mL
Azul de bromofenol	2,5 mg

Completar o volume com água deionizada para 25 mL.

TAMPÃO DO TANQUE (pH 8,9) 10X Concentrado

Trizma base	63,2 g
Glicina	39,9 g

Completar o volume com água deionizada para 1000 mL.

TAMPÃO TAS

Tris-HCl 50mM	2,5 mL
EDTA 50mM	5 mL
NaCl 150mM	1,5 mL

O volume foi completado para 50mL com água deionizada.

TAMPÃO TE

Tris HCl 10mM 1 mL

EDTA 1mM 0,2 mL

O volume foi completado para 100mL com água deionizada.

TAMPÃO DA AMOSTRA PARA DNA

Glicerol 30% 3 mL

Azul de bromofenol 25 mg

Água deionizada 10 mL

TAMPÃO TBE 10X CONCENTRADO

Trizma base 54 g

Ácido bórico 27,5 g

EDTA 0,5M 20 mL

O volume foi completado com água deionizada para 500 mL.

4.4 Atividade bacteriocinogênica.

A produção de bacteriocina das linhagens de *Z. mobilis* contra as bactérias reveladores foi verificada pelo teste de antagonismo direto, segundo AZEVEDO & COSTA (1973).

Como esquematizado na figura 1, as linhagens de *Z.mobilis* foram cultivadas em caldo SSDL a 30°C por 24 horas, e 2µL deste fermentado foram inoculados em quatro pontos na placa de Petri contendo ágar Schreder. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. As placas foram tratadas com vapor de clorofórmio durante 15 minutos e em seguida foram deixadas abertas por 30 minutos para eliminar o clorofórmio por evaporação. Após esse tratamento, adicionou-se às placas cerca de 4 ml de meio AN semi-sólido contendo 10⁶células de cada microrganismo revelador. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. O antagonismo foi observado pela formação de um halo de inibição em volta de cada colônia de *Z. mobilis*.

4.4.1 Avaliação do meio de cultura e temperatura de incubação na produção de bacteriocina por *Z. mobilis*.

A atividade bacteriocinogênica foi avaliada em dois meios de cultura diferentes, ágar SSDL (ítem 4.2.2) e ágar Schreder (ítem 4.2.2), e incubadas a 30°C e 37°C durante 24 horas, pelo método do antagonismo direto já descrito anteriormente. Como reveladora sensível foi utilizada *E. coli* K12. As placas foram analisadas quanto à formação de halos de inibição.

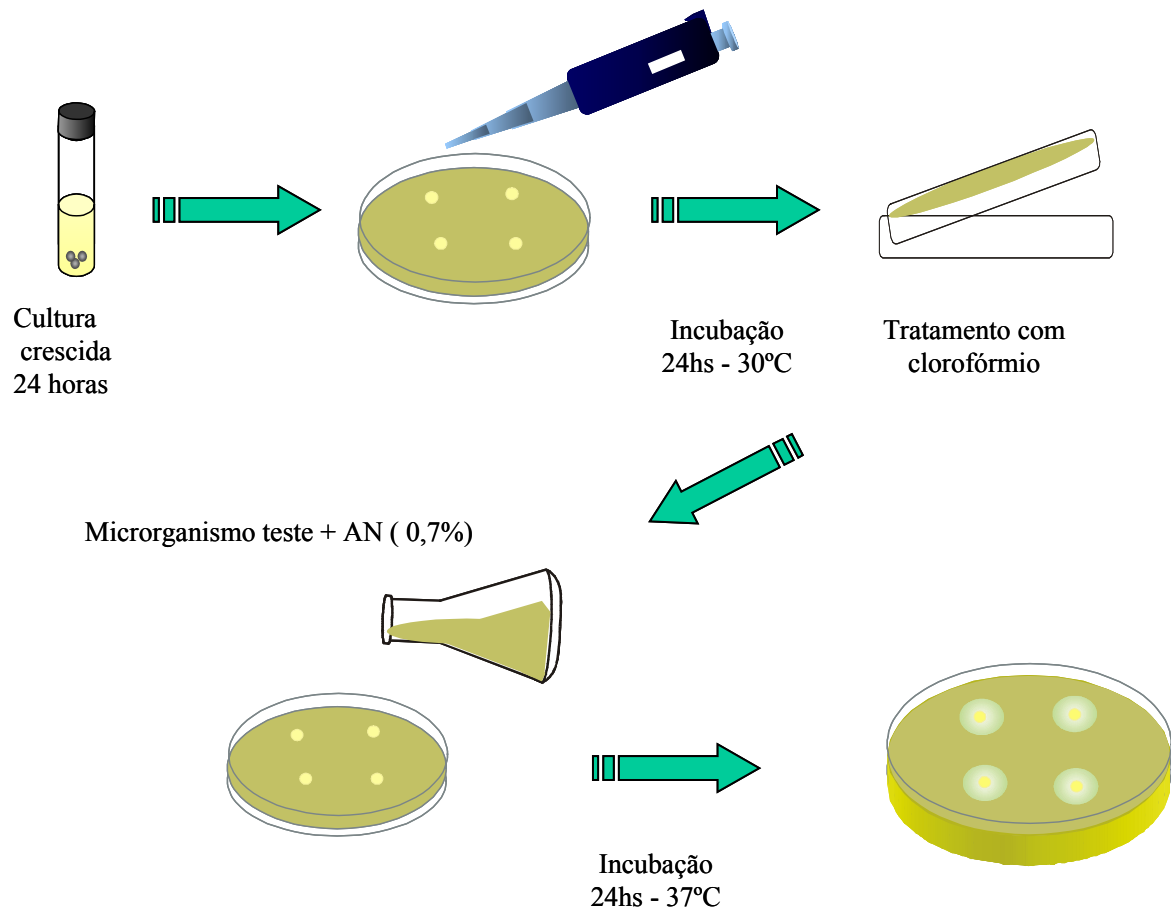


Figura 1 Esquema do teste de atividade bacteriocinogênica pelo método do antagonismo direto com linhagens de *Z. mobilis* no meio Schreder a 30°C.

4.5. Caracterização das bacteriocinas

4.5.1 Avaliação da presença de bacteriófagos

Esse teste foi realizado segundo metodologia de LEWUS et al. (1991), para verificar a presença de bacteriófagos no meio, de modo que estes possam ser os responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano.

Um pequena porção do ágar (3 mm de diâmetro) contendo o halo de inibição foi removido assepticamente, e adicionado a 1,5 mL de meio líquido, seguido de trituração com bastão de vidro esterilizado. A mistura foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Alíquotas de 100 µl da suspensão e 100 µl da linhagem indicadora *E. coli* K12 foram adicionados ao ágar semi-sólido e distribuídos nas placas de Petri, as quais foram incubadas por 24 horas. Após esse período, foi realizada a leitura quanto à presença de zonas líticas.

4.5.2 Ocorrência de bacteriocina no sobrenadante

As linhagens de *Z. mobilis* foram cultivadas em meio Schreder por 24 horas, os fermentados foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, neutralizados com NaOH 10 N (pH 7,0) e esterilizados por filtração em membrana 0,22 µm (Milipore). 30 µL de cada sobrenadante foram adicionados aos discos de papel e colocados no meio de cultivo contendo 10⁶ células/mL do microrganismo indicador (*E. coli* K12). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Com a finalidade de eliminar a possibilidade da atividade antagonista ser causada por ácidos, o teste também foi realizado com o sobrenadante não neutralizado.

4.5.3 Determinação da estabilidade da bacteriocina.

A termoestabilidade da bacteriocina foi avaliada segundo técnica descrita por LEWUS (1991). Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram incubadas a diferentes temperaturas: 42°C, 60°C, 80°C e 100°C, por 15 minutos. Em seguida, foram resfriadas por cerca de 60 minutos a 4°C. Após esse tempo, foi testada a atividade bacteriocinogênica segundo método de difusão em discos de papel, utilizando a *E. coli* K12 como linhagem indicadora sensível, e tendo como controle o sobrenadante não tratado.

4.5.4 Avaliação da natureza protéica

A avaliação do efeito da enzima proteolítica sobre a atividade bacteriocinogênica foi realizada, conforme método modificado de Lewus et al. (1991). 200 µL do sobrenadante foram tratados com 10 µL de proteinase K (10 mg/mL), durante 90 minutos a 30°C, para permitir a digestão da enzima. Em seguida, a atividade biológica foi testada e comparada com a do sobrenadante não tratado.

4.6 Cinética da produção de bacteriocina.

Em 250 mL de meio Schreder foram inoculados 10% (v/v) da cultura de *Z. mobilis* Z1-87 e incubados a 30°C durante 48 horas. Em intervalos regulares de 3 horas, alíquotas foram retiradas para a determinação da absorbância a 600 nm e avaliação da produção de bacteriocina pelo método de difusão em disco (item 4.5.2), utilizando a *E. coli* K12 como linhagem indicadora. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student, tendo como nível de significância $p < 0,05$.

4.7 Caracterização Molecular

4.7.1 Análise de proteínas totais (SDS-PAGE)

A análise de proteínas totais foi realizada conforme metodologia VAUTERIN et al. (1991).

Uma alíquota de 6 mL da cultura de *Z. mobilis* crescida durante 24 horas foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. A massa celular foi lavada com 1,5 mL de tampão TE, novamente centrifugada e ressuspendida em 0,3 mL do mesmo tampão. Em seguida, foram adicionados 60 µL de SDS 10% e homogeneizados até que a mistura ficasse transparente e viscosa. Posteriormente, 200µL de tampão da amostra (foram acrescentados aos tubos e estes foram incubados a 100°C para ferver por 3 minutos. Alíquotas de 50 µL de cada amostra foram aplicados nos poços do gel de poliacrilamida contendo SDS e em seguida, procedida a corrida com uma voltagem inicial de 100 volts. Após a passagem da amostra para o gel separador a voltagem foi aumentada para 200 volts sendo mantida até o final da corrida.

Após a corrida o gel foi transferido para uma solução corante por 4 horas. Em seguida foi realizada a descoloração até que as bandas aparecessem nítidas.

4.7.2 Extração do DNA total

O DNA das linhagens de *Zymomonas mobilis* foi extraído mediante técnica descrita por Sambrook et al. (1989). Cinco mL do cultivo de *Z. mobilis* (caldo SSDL por 24 horas, a 30°C) foram centrifugados a 12.000 rpm, por 5 minutos, e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado com 1,5 mL de tampão TAS, novamente centrifugado e ressuspendido em 0,5 mL do mesmo tampão. A amostra foi tratada com proteinase K (150 µg/mL) e SDS 2% e incubada a 50°C por 60 minutos. Foram adicionados 400 µL de fenol ao sobrenadante, homogeneizado e centrifugado por 2 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para outro tubo, acrescida de 500 µL de clorofórmio e centrifugada por 2 minutos. Foi acrescentado acetato de potássio (pH 5,2) 30 mM e precipitado com etanol absoluto por 1 hora. O material foi centrifugado, o sobrenadante desprezado,

lavado com 400 μL de etanol a 70% e novamente centrifugado por 2 minutos. Depois de seco, o sedimento foi ressuspensionado em 50 μL de tampão TE.

Após finalizar os procedimentos de extração do DNA a integridade e a concentração do DNA foram avaliadas por eletroforese. Foram retirados 5 μL de cada amostra e adicionados 3 μL do tampão da amostra, misturados e depositados nos poços do gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera Polaroid. A concentração de DNA nas amostras foi estimada por comparação com amostras de DNA de fago lambda, utilizadas em concentrações conhecidas.

4.7.3 Condições de amplificação (RAPD e rep-PCR)

O RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) explora a capacidade de duplicação do DNA onde uma fita simples será usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob ação da DNA polimerase, que tem a capacidade de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, de acordo com a fita molde.

A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 μL que continha tampão 10X, dNTPs (100 μM .), MgCl_2 (3mM.) e Taq polimerase (2U) e 3 μL da amostra de DNA (Tabela 3). Os controles das reações foram efetuados de forma similar, sem adição de DNA. As misturas reagentes foram colocadas em termociclador, programado para realizar inicialmente uma desnaturação a 94°C por 3 minutos, uma única vez, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 37°C e por fim 1 minuto a 72°C Após o processo de amplificação, 5 μL das amostras foram misturados com 3 μL do tampão da amostra, aplicados nos poços de agarose 1,2% com brometo de etídio e separados por eletroforese. Ao final da corrida o gel foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera Polaroid.

Tabela 3 Componentes do MIX de amplificação de DNA dos isolados de *Z. mobilis* utilizando a reação de RAPD e rep-PCR.

Componentes	Volume na reação RAPD	Volume na reação ERIC	Volume na reação REP
MgCl ₂ (3mM)	1,5 µL	1,4 µL	1,4 µL
Tampão (10x)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
dNTP (100µM)	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Primer (5 µM)	3,0 µL	1,25 µL	2,5 µL
Agua milli Q	14 µL	15,85 µL	14,6 µL
Taq polymerase (5U/ µL)	0,4 µL	0,4 µL	0,4 µL
DNA	3 µL	3 µL	3 µL
Total	25 µL	25 µL	25 µL

4.7.4 Reação de rep-PCR

O processo de amplificação pela reação de rep-PCR (primers ERIC e REP) foi realizado utilizando as mesmas condições citadas no ítem 4.7.3, existindo diferença apenas nas quantidades dos componentes presentes na mistura da reação (tabela 3).

Após a amplificação, 15 µL do material foram retirados, misturados com 5 µL do tampão da amostra (ítem 4.4.7) e aplicados nos poços do gel de agarose 1,4% e submetidos à eletroforese. Ao final, as bandas foram visualizadas no transiluminador de luz ultravioleta.

4.8 Análise dos dados

As bandas de DNA foram analisadas quanto à presença (1) ou ausência (0) de bandas em cada linhagem. A matriz de similaridade foi construída através da utilização do

programa NTSYS, com o método UPGMA (Unweighed Pair Group Method with Arithmetic mean), por meio do coeficiente de Jaccard (SJ).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade bacteriocinogênica

A capacidade de produzir compostos com atividade bacteriocinogênica foi investigada em seis linhagens de *Z. mobilis* utilizando-se o teste descrito previamente (item 4.4). Como linhagens sensíveis foram utilizadas diferentes espécies de bactérias patogênicas ao homem (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*). Todas as linhagens de *Z. mobilis* ensaiadas apresentaram atividade bacteriocinogênica em diferentes graus, capazes de sintetizar e liberar inibidores que são letais para outras bactérias.

Foi observado que o padrão de atividade das bacteriocinas pode variar de uma linhagem para outra e os halos de inibição produzidos também podem variar quando testados com diferentes linhagens indicadoras (Figura 2). As linhagens de *Z. mobilis* Z1-86B e Z1-87 produziram os maiores halos de inibição de 28 e 30mm para *E. coli* K12, sendo destacadas como as melhores produtoras de bacteriocina. Por outro lado, *S. faecalis* apresentou resistência às bacteriocinas produzidas pelas linhagens de *Z. mobilis*.

Bactérias que são insensíveis à ação de bacteriocinas podem ser consideradas resistentes, dependendo do modo de ação da bacteriocina e da resposta emitida. O mecanismo pelos quais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas manifestam resistência às bacteriocinas não é bem entendido. Contudo, o mecanismo dessa resistência parece ser diferente do mecanismo de imunidade apresentado pelas linhagens produtoras a sua própria bacteriocina. Acredita-se que o mecanismo de resistência a bacteriocina esteja associado com a perda de receptores celulares (TAGG et al., 1995).

Das seis linhagens testadas, quatro (66,66%) apresentaram atividade contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, evidenciando o amplo espectro de ação das linhagens Z1-86A, Z1-86B, Z1-87 e Z1-88, cujos halos de inibição variaram de 5 a 13 mm.

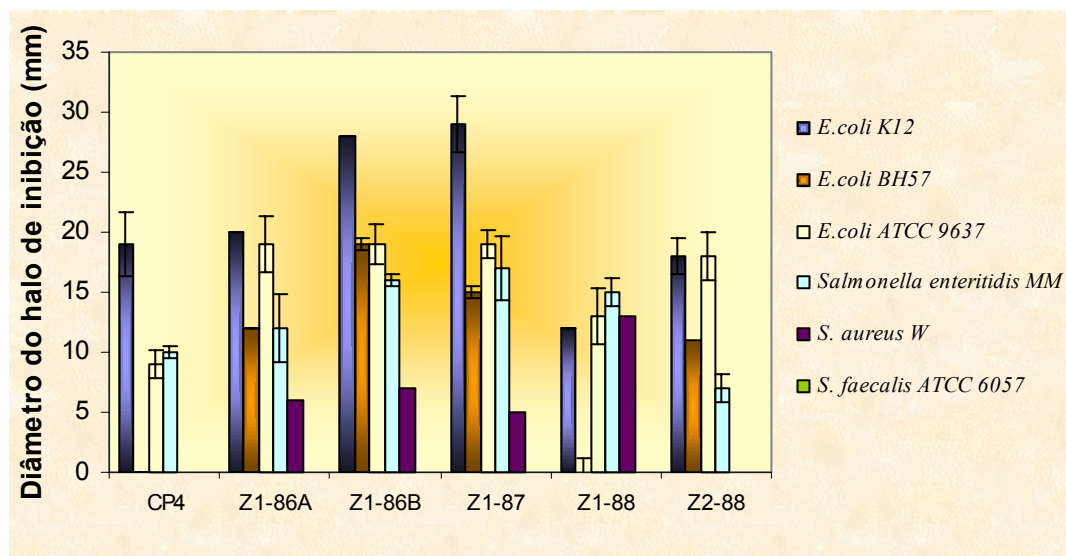


Figura 2 .Diâmetro dos halos de inibição (mm) produzidos por diferentes linhagens de *Z. mobilis*, utilizando *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e diferentes linhagens de *E. coli*, como linhagens indicadoras.

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas, de uma maneira geral, apresentam um espectro de ação mais limitado às espécies mais próximas. Contudo, muitos trabalhos demonstram a capacidade de certas bactérias Gram-negativas atuarem contra outros microrganismos não relacionados taxonomicamente (MIRANDA et al., 1993).

No presente trabalho, as linhagens de *Z. mobilis* apresentaram atividade bacteriocinogênica contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *S. enteritidis*) indicando o amplo espectro de ação desses inibidores.

Trabalhos realizados por OLIVEIRA et al. (1998) mostraram que a bacteriocina produzida pelas linhagens de *Fusobacterium* também apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Nossos resultados encontram apoio também nas descrições preliminares obtidas por TAN & ROGERS (2000), que ao estudarem a atividade bacteriocinogênica de linhagens de *Z. mobilis* selvagem e recombinante, verificaram resultados significativos quando utilizavam como reveladoras sensíveis *E. coli* K12 e *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*.

Neste trabalho a linhagem *E. coli* K12 foi identificada como linhagem indicadora sensível por ter apresentado maior halo de inibição para todas as linhagens de *Z. mobilis* testadas, sendo, portanto selecionada para os demais experimentos.

5.1.1 Avaliação do meio de cultura e temperatura de incubação.

A fim de examinar a influência da temperatura e do meio de cultura na produção de bacteriocina, foram utilizados os meios SSDL e Schreder, a 30°C e a 37°C. Os experimentos foram realizados com as linhagens de *Z. mobilis* CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 e Z2-88, em triplicata. Levando em consideração que 30°C e 37°C são temperaturas ótimas de crescimento para estas bactérias, também foi avaliado nesse trabalho a influência dessas temperaturas na produção de bacteriocina. Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4 mostram uma boa produção de bacteriocina pelas linhagens de *Z. mobilis* nos meios SSDL e Schreder.

Através do tamanho dos halos de inibição foi verificado que a produção de bacteriocina se apresentou um pouco superior no meio Schreder, nas diferentes temperaturas empregadas ($p < 0,05$). Comparando a composição dos dois meios de cultura utilizados no presente trabalho, observa-se que a maior diferença entre eles consiste na presença de alguns sais (sulfato de amônio, sulfato de magnésio e fosfato de potássio) e na concentração do extrato de levedura no meio Schreder. Entretanto, a influência desses componentes não foi sistematicamente averiguada uma vez que as diferenças detectadas nos halos de inibição foram pequenas. Apesar da leve superioridade do meio Schreder em relação ao meio SSDL, os halos de inibição observados no meio Schreder foram mais nítidos e uniformes (Figuras 5 e 6).

Os resultados obtidos com a linhagem CP4 mostraram melhor produção de bacteriocina no meio SSDL, a 37°C, com halo de inibição de 19 mm, enquanto para a linhagem Z1-86A foi no meio Schreder, a 37°C, que apresentou maior halo de inibição de 25mm.

A linhagem Z1-87 foi a que apresentou maior halo de inibição entre todas as linhagens produtoras, porém o tamanho do halo foi maior no meio Schreder a 37°C, indicando maior produção de bacteriocina. À temperatura de 30°C, não houve diferença

significativa ($p < 0,05$) entre os dois meios, sendo ambos eficientes para a produção dessa substância antagonista (Figura 6).

As linhagens Z1-86B e Z2-88 apresentaram uma maior produção de bacteriocina no meio Schreder, a 30°C e quando empregada a temperatura de 37°C não houve diferença significativa entre os meios testados.

Para a linhagem Z1-88 a produção foi igual para os dois meios, com formação de halo de inibição que variaram de 12-16mm.

De uma maneira geral, os dois meios foram bons para avaliar a atividade antagonista dos isolados de *Z. mobilis*, porém com formação de halo um pouco superior para a linhagem Z1-87 no meio Schreder a 37°C.

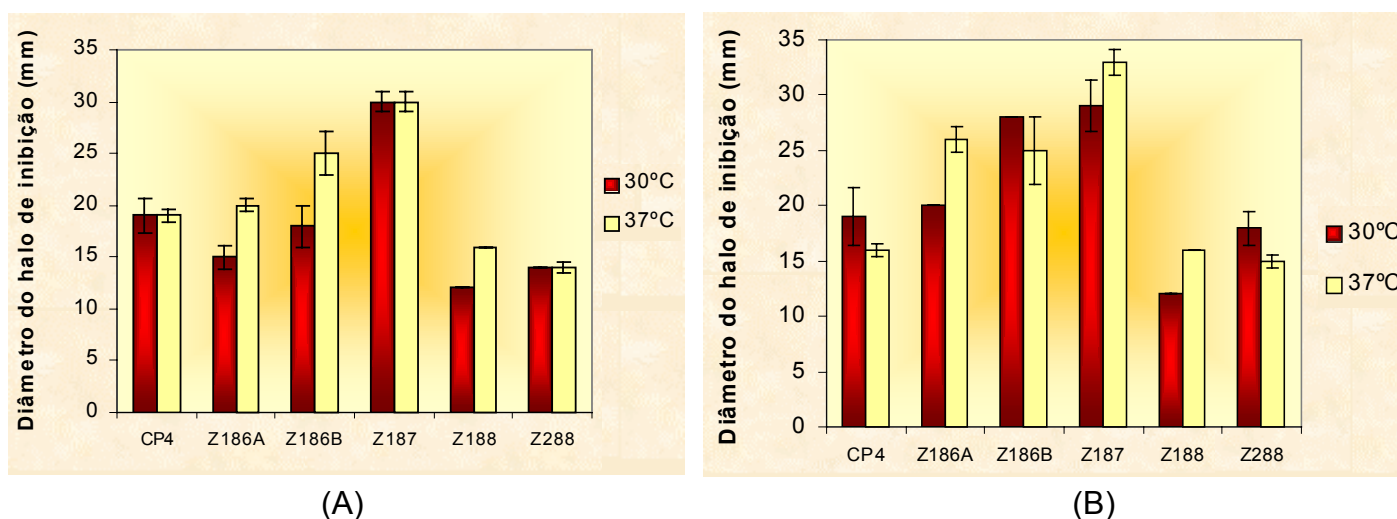


Figura 3 Diâmetro dos halos de inibição (mm) produzido por linhagens de *Z. mobilis* nos meios SSDL (A) e Schreder (B) a diferentes temperaturas utilizando *E. coli* K12 como linhagem indicadora.

Esses dados refletem que a produção e a sensibilidade das linhagens reveladoras a bacteriocina de *Z. mobilis* dependem das condições de cultivo empregadas. Vários autores demonstram que as condições de cultivo (meio de cultura e temperatura) influenciam no rendimento efetivo da bacteriocina, sendo importante utilizar diferentes condições de cultivo. Células que possuem informações genéticas para a síntese de bacteriocinas não fazem em todas as condições de cultivo e pouco se conhece a respeito dos fatores que influenciam a expressão dessas substâncias nos diversos ecossistemas (TAGG et al., 1976). Em alguns casos a presença de componentes específicos, como por exemplo, glicerol, foi associado a maior produção de antibióticos por linhagens de *Erwinia*

carotovora (AXELROOD et al., 1988), enquanto em outros casos a maior produção de bacteriocina foi correlacionada com o crescimento celular (BISWAS et al., 1991). OLIVEIRA et al (1998) também evidenciaram que a composição dos meios de cultura interferem na atividade bacteriocinogênica das linhagens de *Fusobacterium*.

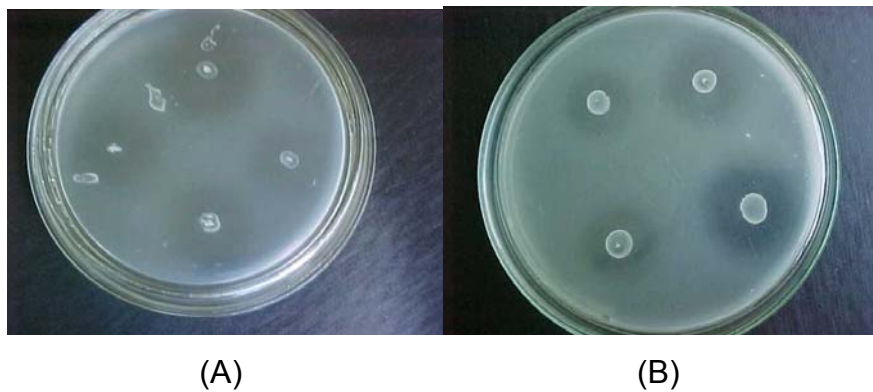


Figura 4 Atividade inibitória da bacteriocina produzida pela linhagem Z1-86B contra *E. coli* K12 nos meios Schreder (A) e SSDL (B).

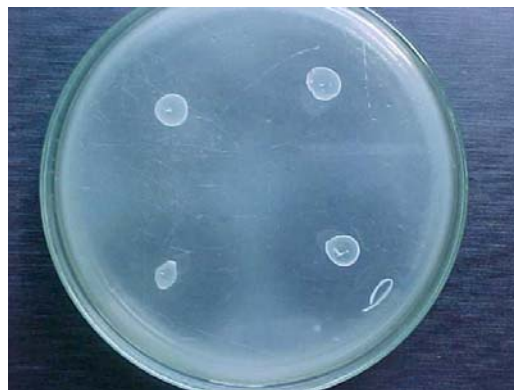


Figura 5 Atividade inibitória da bacteriocina produzida pela linhagem Z1-87 contra a *E. coli* K12 no meio Schreder.

5.2 Caracterização das bacteriocinas.

Ao analisar a bacteriocina é importante eliminar fenômenos não relacionados que podem exercer um antagonismo similar no teste. Outros produtos, tais como: ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriófagos, podem também exercer efeito inibitório frente a outros microrganismos.

GONÇALVES DE LIMA et al. (1968) tentaram relacionar a atividade inibitória de *Z. mobilis* à biossíntese do ácido láctico, porém não obtiveram resultados que justificassem que a atividade inibitória estava relacionada com a produção do ácido láctico. Estudaram também o efeito do peróxido de hidrogênio na inibição microbiana e verificaram que *Z. mobilis* não é capaz de produzir este composto, não sendo esse o responsável pela atividade antimicrobiana.

No presente trabalho foi verificada a possível atuação por bacteriófagos na atividade antagonista. Este ensaio tem sido recomendado por TURNER & JORDAN (1981) para excluir a interferência pela ação de bacteriófagos que também são capazes de produzir zonas líticas similares aos halos de inibição promovidos pelas bacteriocinas. O experimento foi efetuado com as seis linhagens de *Z. mobilis* (CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 e Z2-88) utilizando *E. coli* K12 como linhagem indicadora. Não foi visualizada a formação de placas de lise, mostrando que o halo de inibição não pode ser atribuído à presença de bacteriófagos. Resultados similares foram obtidos por MIRANDA et al. (1993) e OLIVEIRA et al. (1998) os quais mostram respectivamente que as atividades inibitórias observadas em *Bacteroides ovatus* H47 e *Fusobacterium spp.* não estão correlacionados com a presença de bacteriófagos.

Outro fator importante para a caracterização da bacteriocina foi testar os sobrenadantes neutralizados e não neutralizados a fim de eliminar a possível presença de ácido no sobrenadante (pH 4,8) como responsável pela ocorrência do halo de inibição. A ocorrência de bacteriocina no sobrenadante foi realizada em triplicata com os filtrados das linhagens CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 e Z2-88. As alíquotas foram testadas com a linhagem indicadora *E. coli* K12 e plaqueada em meio AN, não tendo sido observada diferenças no diâmetro dos halos, permitindo a exclusão da acidez como fator de inibição.

Todas as linhagens produziram bacteriocina no meio líquido Schreder, como pode ser observado na figura 7, onde o sobrenadante das linhagens CP4, Z1-86B e Z1-87 apresentaram maior produção com halos de inibição que variaram de 14-15mm ($p < 0,05$). A presença de bacteriocina no sobrenadante de todas as linhagens sugere que essa substância é liberada naturalmente no meio de cultura, entretanto essa produção foi maior no meio Schreder sólido com formação de halo de inibição de 30 mm. Segundo MAYRHARTING et al. (1972) essa maior produção pode ter sido causada pela possibilidade da célula liberar a bacteriocina no meio sólido mesmo depois de morta.

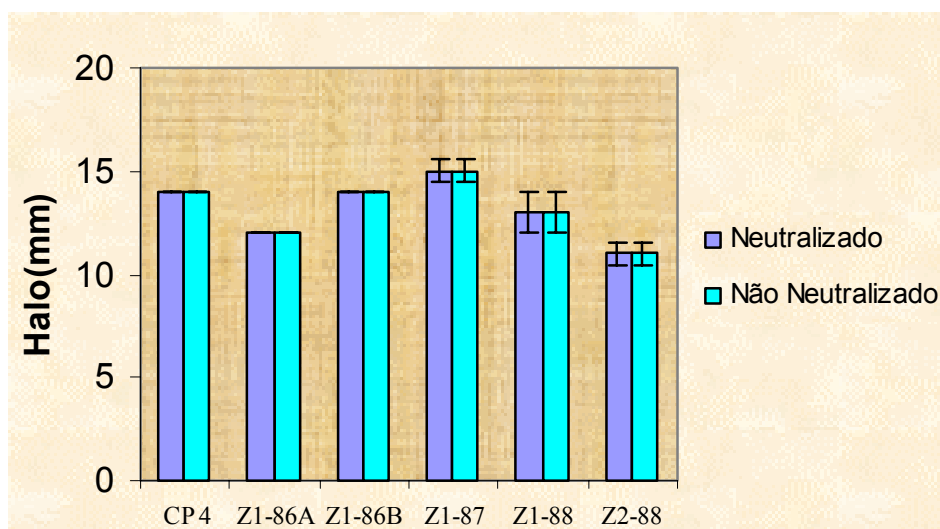


Figura 6 Diâmetro dos halos de inibição (mm) produzidos pelo sobrenadante (neutralizado e não neutralizado) de diferentes linhagens de *Z. mobilis*, utilizando *E. coli* K12 como linhagem indicadora.

A estabilidade da bacteriocina a diferentes temperaturas mostrou que as bacteriocinas produzidas pelas linhagens *Z. mobilis* se mostraram estáveis até 80°C por 15 minutos, porém perderam a atividade quando expostas a 100°C.

Esses parâmetros de termoestabilidade são semelhantes aos obtidos por KELSTRUP & GIBBSON (1969), os quais estudaram a atividade bacteriocinogênica em linhagens de *Streptococcus* orais e verificaram que todas as linhagens testadas, com exceção de uma cepa 130, permaneceram estáveis após tratamento a 80°C.

Resultados semelhantes foram obtidos por ECHANDI (1976), revelando que as bacteriocinas produzidas por linhagens de *Corynebacterium michiganense* quando submetidas a aquecimento a 80°C por 15 minutos ainda apresentavam atividade. A estabilidade térmica das bacteriocinas de bactérias Gram-negativas também pode variar, como relatado por TAKADA et al (1991) para linhagens de *Prevotella intermedia* que foram inativadas pela exposição a 90°C por 5 minutos e por FARIAS et al. (1994), com a bacteriocina produzida por *Bacteroides fragilis* que se manteve estável a 60°C por 24 horas, mas perdeu a atividade a 80°C por 20 minutos.

TAN & ROGERS (2000), observaram que a atividade bacteriocinogênica da linhagem de *Z. mobilis* aumentou três a quatro vezes quando aquecida a 100°C por 30 minutos.

Deve ser salientado que a estabilidade térmica e a susceptibilidade a enzimas proteolíticas em linhagens produtoras de bacteriocinas podem variar entre as linhagens devido aos diferentes métodos empregados (BOOTH et al., 1977; MOOSIE et al., 1979).

Um fator importante para a caracterização da bacteriocina é a sensibilidade da mesma a enzimas proteolíticas. Uma vez que as bacteriocinas são substâncias protéicas devem ser sensíveis a pelo menos uma enzima, como enfatiza LEWUS & MONTVILLE (1991).

A natureza protéica das substâncias produzidas pelas linhagens de *Z. mobilis* foi determinada através da sensibilidade à protease, sendo observado que todas foram sensíveis à proteinase K.

Resultados encontrados na literatura indicam que a sensibilidade das bacteriocinas às enzimas proteolíticas é variável. Assim FARIAS et al. (1994) observaram que a bacteriocina produzida por *Bacteroides fragilis* foi inativada pelas enzimas proteinase K, tripsina, pronase e protease tipo VII. OLIVEIRA & ROSATO (1996) também observaram que a bacteriocina da bactéria Gram-negativa *Xanthomonas campestris* pv *glycines* se apresentou sensível à protease com a perda da atividade biológica. Posteriormente, OLIVEIRA et al. (1998) também verificaram que as bacteriocinas de *Fusobacterium spp.* perderam a atividade quando tratadas com protease e proteinase K, mas não foram inativadas pelas enzimas tripsina e pepsina.

5.3 Cinética da produção de bacteriocina

A linhagem Z1-87 foi selecionada para realizar o monitoramento da produção de bacteriocina por ter apresentado o maior halo de inibição. O crescimento celular ocorreu durante 24 horas com retirada de amostras em intervalos de 3 horas para proceder ao teste de antagonismo com o sobrenadante.

O acompanhamento da produção de bacteriocina ao longo da curva de crescimento revelou, através do tamanho do halo de inibição contra *E.coli* K12, que a produção de bacteriocina iniciou em torno de 4 horas (fase logarítmica) e atingiu o seu valor máximo com 24 horas na fase estacionária com halo de inibição de 14 mm ($p < 0,05$). Ao longo de toda a fase estacionária (24 – 48 horas) a atividade antimicrobiana permaneceu constante (Figura 8).

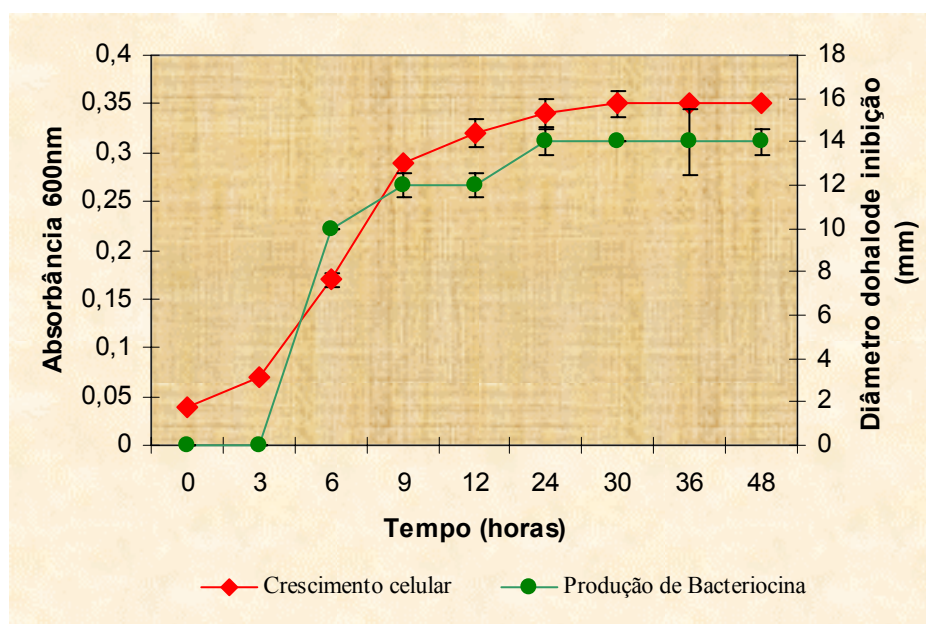


Figura 7 Curva de crescimento e produção de bacteriocina pela linhagem *Z. mobilis* Z1-87, no meio Schreder, a 37°C.

Os resultados obtidos nesse trabalho são muito semelhantes àqueles obtidos por BOOTH et al. (1977) os quais verificaram que a produção da bacteriocina em *Bacteroides* ocorreu durante a fase logarítmica. Essa produção também permaneceu constante durante a fase estacionária. Igualmente, OLIVEIRA & ROSATO (1996) observaram

também que a produção de bacteriocina pelas linhagens de *Xanthomonas* ocorreu na fase logarítmica.

5.4 Análise da variabilidade genética das linhagens bacteriocinogênicas de *Z. mobilis*.

5.4.1 SDS-PAGE

A análise de proteínas totais das linhagens de *Z. mobilis* foi realizada por SDS-PAGE. O perfil eletroferético das bandas de proteínas se mostrou muito homogêneo entre todas as linhagens testadas, indicando que as proteínas se mantiveram muito conservadas (Figura 8). Em decorrência deste resultado, foram utilizadas as técnicas de RAPD e rep-PCR para demonstrar diferenças entre as linhagens.

SILVA (2000) em suas pesquisas com linhagens parentais e recombinantes de *Z. mobilis* observou que a análise de proteínas totais foi eficiente para caracterizar as linhagens parentais (Ag-11 e ZAP) e recombinantes (ZAG-4, ZAG-6, ZAG-10 e ZAG-12). Os resultados mostraram que a linhagem ZAP apresentou um maior número de bandas.

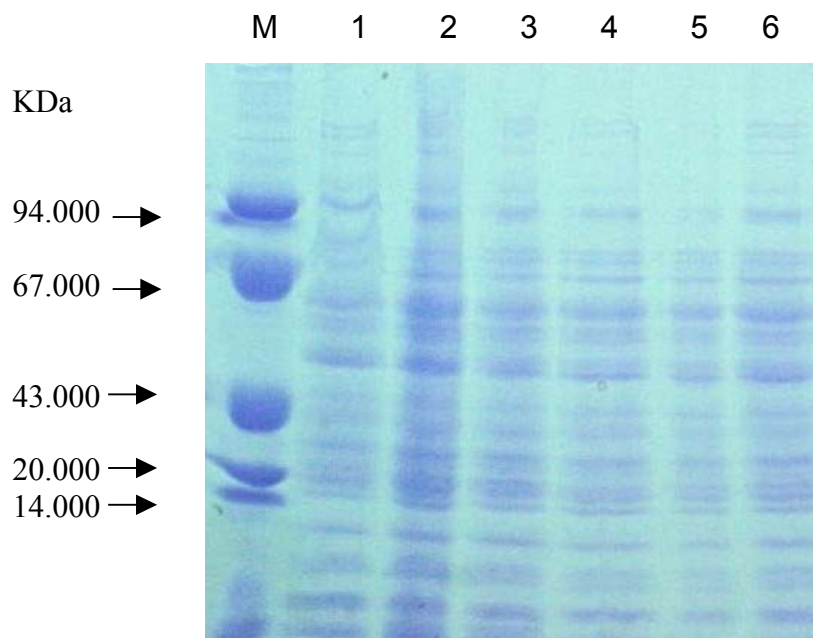


Figura 8 Eletroforese de proteínas totais. Nos poços estão: Marcador (M) e de 1 a 6 encontram-se os extratos das linhagens de *Z. mobilis*, CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 e Z2-88.

5.4.2 Quantificação do DNA.

O DNA total foi extraído de todas as seis linhagens de *Z. mobilis* empregando-se 1,5mL de culturas crescidas em meio SSDL, durante 24 horas. As amostras foram analisadas eletroforicamente em gel de agarose 0,8% para verificar as concentrações e a qualidade das amostras. A concentração de DNA foi estimada por comparação com amostras de DNA de fago lambda, colocadas no gel e contendo concentrações conhecidas. Todas as amostras de DNA obtidas foram diluídas em tampão TE para se obter no final uma concentração aproximadamente de 10-15ng/ μ L.

5.4.3 RAPD

Inicialmente, foram utilizados 13 primers a fim de padronizar as condições da reação de PCR e escolher primers apropriados, capazes de produzir bandas bem definidas que permitissem a visualização do polimorfismo entre as linhagens estudadas. No entanto, foram escolhidos apenas 7 primers para acessar a diversidade genética entre as 6 linhagens de *Z. mobilis*. A seqüência de nucleotídeo dos primers selecionados encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 Primers selecionados para utilização na reação de RAPD.

Primer	Seqüência
OPQ-04	AGT GCG CTG A
OPR-01	TGC GGG TCC T
OPR-04	CCC GTA GCA C
OPA-08	GTG ACG TAG G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPX-17	GAC ACG GAC C
OPX-19	TGG CAA GGC A

Os sete primers geraram um total de 47 bandas, com uma média de 6 bandas por primer. Dentre estas, 53,2% foram polimórficas, ou seja, pelo menos uma linhagem não apresentou a banda e 46,8% monomórficas, as bandas estavam presentes em todas as linhagens.

Os fragmentos gerados pelos diferentes primers variaram de 0,3 a 4,0 kb. Foram observadas diferenças na intensidade de algumas bandas, entretanto essas diferenças não foram consideradas desde que a análise foi qualitativa, baseada apenas na presença e ausência de bandas. Pelo menos duas repetições foram efetuadas para cada linhagem por primer. O maior número de bandas foi gerado com o uso do primer OPA-09 que produziu 9 bandas enquanto o primer OPR-01 amplificou um menor número de bandas, 4 (figura 9). O primer OPA-09 gerou o maior polimorfismo: dentre 9 bandas produzidas, 6 foram polimórficas, sendo portanto um primer útil para detecção de diversidade genética em *Z. mobilis*. Os fragmentos amplificados variaram de 0,5 a 4,0 Kb e 3 bandas (0,8, 1,1 e 1,6) estavam presentes em todas as linhagens de *Z. mobilis* (Figura 11).

A análise das bandas geradas com o uso dos diferentes primers permitiu a construção do dendograma (Figura 12). Observando-se o dendograma é aparente que as linhagens apresentam diferenças entre elas, mas um alto grau de similaridade é mantido, de aproximadamente 70%. Dois grupos são formados: o primeiro inclui as linhagens Z1-86A e Z1-86B e o segundo as demais linhagens, CP4, Z1-87, Z1-88 e Z2-88. As linhagens CP4 e Z1-87 apresentaram alto índice de similaridade, de aproximadamente 80%. O mesmo grau de similaridade foi encontrado no outro grupo pelas linhagens Z1-86A e Z1-86B. A similaridade entre essas duas últimas linhagens pode ser explicada pelo fato de ambas terem sido isoladas da mesma Usina (Usina Maravilhas) no estado de Pernambuco e pelas semelhanças nas características morfológicas. Quanto às demais linhagens, as diferenças detectadas por RAPD podem ser um reflexo dos diferentes locais e anos de coleta, previamente descritos por FALCÃO DE MORAIS et al. (1993). A análise de *Z. mobilis* através do RAPD já foi utilizada por SILVA (2000) para observar as diferenças entre linhagens parentais de *Z. mobilis* (AG11 e ZAP) e as linhagens recombinantes ZAG-4, ZAG-6, ZAG-10 e ZAG-12, entretanto, o uso de apenas dois primers não foi suficiente para discriminar as diferenças.

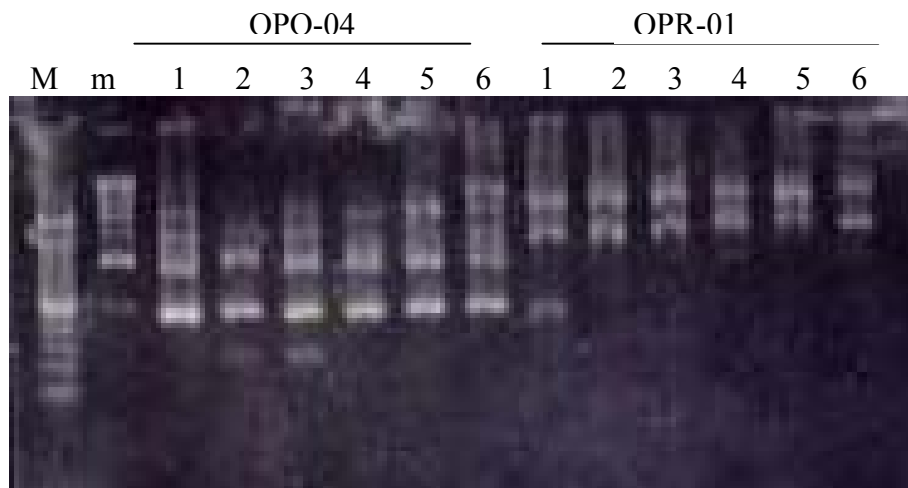


Figura 9 Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtidos com os primers OPR-04 e OPR-01. Na ordem estão: M (marcador 1Kb), m (100pb), nos poços de 1 a 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.

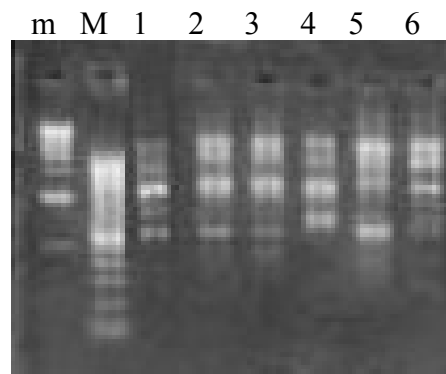


Figura 10 Análise eletroforética dos produtos de amplificação obtidos com o primer OPR-04. Na ordem estão: M (marcador 1Kb), m (100pb), nos poços de 1 a 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.

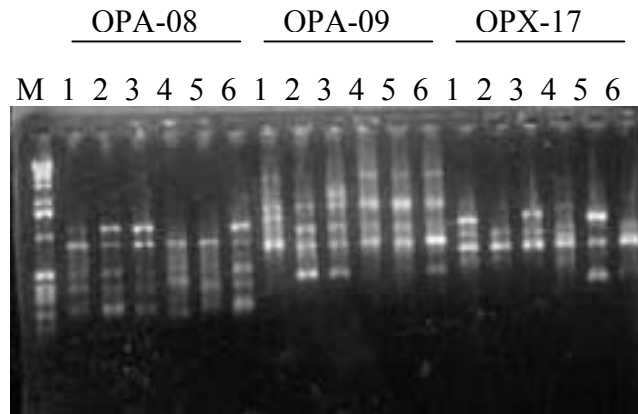


Figura 11 Análise eletroforética dos produtos obtidos pela amplificação do DNA obtidos com os primers OPA-8, OPA-9 e OPX-17. Nos poços estão: M (marcador 1Kb), nos poços de 1 a 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.

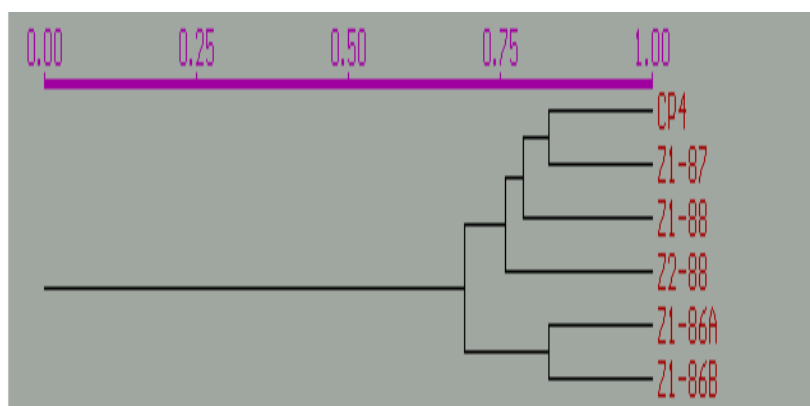


Figura 12 Dendrograma construído a partir dos perfis de RAPD obtidos das 6 linhagens de *Zymomonas mobilis*, utilizando-se o método UPGMA-SJ.

A detecção de diversidade genética utilizando as bandas geradas por RAPD têm sido utilizada em diversos grupos de bactérias, fungos fitopatogênicos e microrganismos de importância médica (HARRY et al., 2001). Segundo KHALED et al. (1997), a análise por RAPD tem sido muito empregada para identificação de organismos em nível de linhagem. Sendo considerada uma importante ferramenta taxonômica e filogenética. Os autores verificaram que o perfil de RAPD gerado foi eficiente para analisar a similaridade entre as linhagens de *Lactobacillus*.

GONÇALVES & ROSATO (2000) estudaram a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* através da análise de RAPD, a qual foi capaz de demonstrar um alto nível de polimorfismo, formando 15 grupos com nível de similaridade de 70%. E comprovaram que a similaridade dos grupos estava relacionada com os locais de origem.

5.4.4 rep-PCR

A diversidade genética em *Z. mobilis* foi também testada pela técnica de rep-PCR, utilizando os primers ERIC e REP (Tabela 5).

Tabela 5 Primers selecionados para utilização na reação de rep-PCR.

Primer	Seqüência
REP	REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3')
ERIC	ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGACG-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGATGGGATTAC-3')

Os produtos de PCR produziram 18 bandas que variaram de 0,22 a 3,0 Kb. À semelhança de RAPD, bandas de mesmo tamanho, mas com intensidades diferentes, foram consideradas como apresentando o mesmo padrão.

Como pode ser observado na figura 13, o primer ERIC produziu 8 bandas (de 0,3 a 1,6 Kb) sendo 4 polimórficas. O primer REP permitiu a detecção de um maior nível de

polimorfismo entre as linhagens de *Z. mobilis*, com amplificação de 10 bandas, das quais 3 estavam presentes em todas as linhagens.

O dendograma construído a partir do rep-PCR (Figura 14), apresenta semelhanças com aquele obtido com os resultados de RAPD mas com maior resolução para detecção de variabilidade. As linhagens apresentaram similaridade ao nível de 60%, contrastando com o nível de 70% encontrado com RAPD. Observar que no caso com os primers rep, apenas dois tipos de primers foram utilizados enquanto que com RAPD foram empregados 7. Os agrupamentos formados (2 principais) apresentam semelhanças, como mencionado, com aqueles de RAPD. Num grupo encontram-se as linhagens Z1-86A e Z1-86B (similaridade de 87%) e no segundo grupo as demais linhagens. As maiores diferenças entre os dois dendogramas obtidos referem-se às relações de similaridade dentro do segundo grupo.

Esses dados coincidem com as semelhanças fisiológicas como também as características morfológicas, como a floculação das células em meio líquido. Sendo a floculação uma característica de todas as linhagens *Z. mobilis* pertencentes à coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos, com exceção de algumas linhagens como a Ag11 e ZAG-12.

A análise por rep-PCR mostrou ser mais útil na detecção da variabilidade das linhagens de *Z. mobilis*, possibilitando detectar um alto nível de polimorfismo, principalmente quando o primer REP foi utilizado:

GONÇALVES & ROSATO (2000) utilizaram vários métodos de PCR para verificar a variabilidade genética de linhagens de *Xanthomonas*, entre esses métodos o rep-PCR, onde observaram que esse primer era capaz de gerar um alto nível de polimorfismo entre as linhagens.

De acordo com LOUWS et al. (1994), o rep-PCR é uma ferramenta importante para o estudo de bactérias fitopatogênicas e fungos. Sendo também útil no diagnóstico de doenças infecciosas e na análise epidemiológica de patologias humanas.

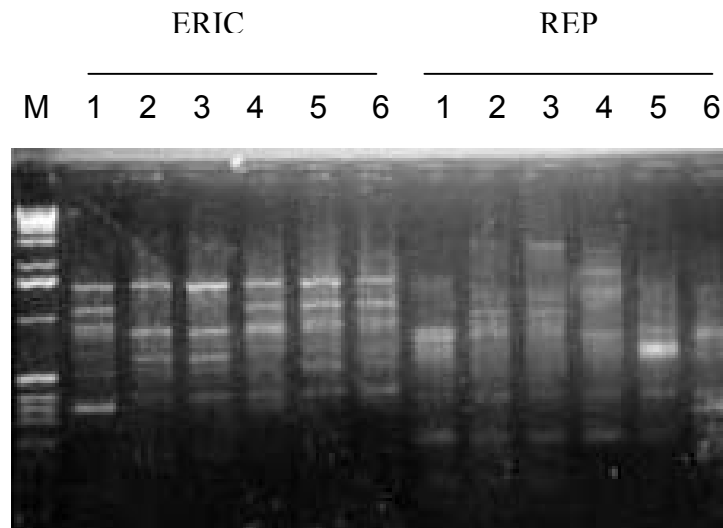


Figura 13 Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA obtidos com os primers ERIC e REP, respectivamente. Nos poços estão: M (marcador 1Kb), nos poços de 1 a 6: CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 E Z2-88.

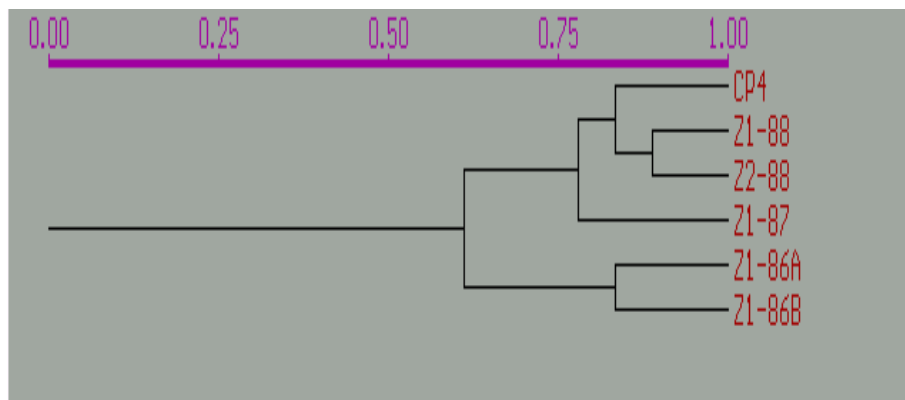


Figura 14 Dendrograma construído a partir dos perfis de rep-PCR obtidos das linhagens de *Zymomonas mobilis*, utilizando-se o método UPGMA, coeficiente SJ.

6. CONCLUSÕES

❖ Todas as linhagens de *Zymomonas mobilis* apresentaram atividade bacteriocinogênica contra *Escherichia coli* K12, *E. coli* ATCC 9637, e *Salmonella enteritidis* ;

❖ A linhagem Z1-87 se destacou como a maior produtora de bacteriocina no meio Schreder a 37°C , sendo a bacteriocina liberada na fase logarítmica de crescimento;

❖ A presença da atividade inibitória do sobrenadante das linhagens de *Z. mobilis* não foi causada pela produção de ácidos e nem pela ação de bacteriófagos, além do mais o produto ativo foi resistente à temperatura de 80°C durante 15 minutos e sensível à proteinase K, comprovando tratar-se de bacteriocina;

❖ Análise dos perfis de proteínas totais das diferentes linhagens de *Z. mobilis* não foi eficiente para detectar diferenças entre as linhagens;

❖ As técnicas de PCR utilizadas, RAPD e rep, foram capazes de detectar o polimorfismo entre as linhagens. Entretanto, o rep-PCR foi mais eficiente para detectar a variabilidade genética das linhagens. Os perfis de RAPD apresentaram 53,2% de bandas polimórficas e 46,8% monomórficas entre as linhagens. E a técnica rep-PCR detectou um maior nível de similaridade para as linhagens Z1-88 e Z2-88 de 90%.

7. PERSPECTIVAS

Perspectivas para dar continuidade a este trabalho:

- Avaliar a ocorrência de bacteriocina nas demais linhagens de *Zymomonas mobilis* da Coleção de microrganismos do DAUFPE;
- Avaliar a influência da composição do meio de cultura e as condições de cultivo na expressão da produção de bacteriocinas;
- Determinar o peso molecular da(s) bacteriocina(s) intra e extracelulares;
- Determinar a(s) estrutura(s);
- Avaliar a produção em escala industrial para uso terapêutico;
- Caracterizar as demais linhagens de *Zymomonas mobilis* através de técnicas moleculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, G.E.; KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use in novel industrial applications. In: DEMAIN, A. et al. **Manual of industrial and biotechnology**. 2^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 789-808.

ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p. 109-115, 1999.

AXELROOD, P.E.; RELLA, M.; SCHROTH, M.N. Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1222-1229, 1988.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. 3^a ed. São Paulo: Ed. Nacional, Ed. da Universidade de São Paulo, 1973. p. 186-188.

AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. 1^a ed. Goiânia: Ed. da UFG, 1998. 490p.

BARROW et al. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 225-232, 1984.

BIAGI, C.M.R; AZEVEDO, J.L. Detecção de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Scientia Agrícola**, v. 49, p. 1-8, 1992.

BISWAS, S.R.et al. Influence of growth on the production of a bacteriocin, Pediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p. 1265-1267, 1991.

BOOTH, S.J; JOHNSON, J.L; WILKINS, T.D. Bacteriocin production by strains of *Bacterioides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.11, p. 718-724, 1977.

BOTTONE, E.; ALLERHAND, J.; PISANO, M.A. Characteristics of a bacteriocin derived from *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* antagonistic to *Diplococcus pneumoniae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 22, p. 200-204, 1971.

BRAUN, V.; PILSL, R.; GROB, P. Colicins: structure, modes of action, transfer through membranes and evolution. **Arch Microbiol.**, v. 161, p. 199-206, 1994.

BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

CALAZANS, G.M.T. Produção de levana para uso clínico. Tese de Doutorado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

DAESCHEL, M.A. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. California: Academic Press, 1993. p.63-91.

DALLY, E.L.; STOKES, H.W.; EVELEIGH, D.E. A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. **Biotechnology Letters**, v.4, p. 91-96, 1982.

DAW, M.A.; Falkiner, F.R. Bacteriocins: nature, function and structure. **Micron**, v. 27, p. 467-479, 1996.

DEANDA, K. et al. Development of an arabinose-fermenting *Z. mobilis* strains by metabolic pathway engineering. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4465-4470, 1996.

FALCÃO DE MORAIS, J.O. et al. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**, v.31, p. 75-91, 1993.

FARAH, S.B. **DNA segredos & mistérios**. São Paulo: Sarvier. 1997.276p.

FARIAS, L.M; et al. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. **Res. Microbiology**, v. 143, p. 151-159, 1992.

FARIAS, L.M. et al. Extraction, partial purification and characterization of bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callitrix penicillata*. **Res.Microbiology**, v. 145, p. 9-16, 1994.

FERRAZ, E.M. et al. *Zymomonas mobilis* antibiosis – A coadjuvant strategy in the prevention of experimental intraabdominal infection. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v., 13, p. 3-6, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1995. 220p.

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

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

GANGLIANO, V.J.; HINS DILL, R.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* bacteriocin. **Journal of Bacteriology**, v. 104, p 117-125, 1970.

GLAZER, A.N.; NIKAI DO, H. **Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology**. 2. ed. New York: W.H. Freeman Company, 1995. p.372-382.

GONÇALVES DE LIMA, O. Sobre uma interessante e pouco conhecida publicação de Paul Lindner acerca do emprego terapêutico de *Zymomonas mobilis* Kluver e Van Niel, 1936 (*Pseudomonas lindneri*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, p. 119-124, 1958.

GONÇALVES DE LIMA, O; SCHUMACHER, I.E.; ARAÚJO, J.M. Novas observações sobre a ação antagonista de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928), Kluver e Van Niel (1936). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.8, n. ½, p. 19-48,1968.

GONÇALVES DE LIMA, O et al. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 10, p. 3-15,1970.

GONÇALVES DE LIMA, O.; SCHUMACHER, I.E.; ARAÚJO, J.M. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var.*recifensis*. Ecological aspects of some problems in microbiology. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 12, p. 57-69, 1972.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of xanthomonad strain isolated from passion fruit plants (*Passiflora spp*) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 811-821, 2000.

GUNASEKARAN , P. et al. The *sacB* and *sacC* genes encoding levansucrase and sucrase form a gene cluster in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.17, p. 635-642, 1995.

HARDY, K.G. Colicinogeny and related phenomena . **Bacteriology Review**, v. 39, p. 464-515, 1975.

HARRY, M. et al. Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 417-427, 2001.

HIGA, A.; YOSHIDA, E.; MIYOSHI, Y. Characterization of two bacteriocins produced by *Clostridium perfringens*. **Microbiology and Immunology**, v. 35, p. 411-421, 1991.

HOOVER, D.G.; HARLANDER, S.K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. California: Academic Press, 1993. p.23-39.

JABRANE, A et al. A screening technique to isolate bacterial strains producing high molecular weight bacteriocins. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 751-754, 1994.

JACK, R.W; TAGG, J.R; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, v. 59, p. 171-200, 1995.

JIMENEZ-DIAZ, R. et al. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 59, p. 1416-1424, 1993.

KHALED, A.K.D.; ENHILAN, B.A.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 191.197, 1997.

KANG, H-L; KANG, H-S. A physical map of the genome of ethanol fermentative bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4 and localization of genes on the map. **Gene**, v. 206, p. 223-228, 1998.

KELSTRUP, J.; GIBSON, R.J. Bacteriocins from human and rodent streptococci. **Archs.Oral Biol.**, v. 14, p. 251-258, 1969.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 12, p. 39-86, 1993.

KOLTER, R.; MORENO, F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. **Annual Review Microbiology**, v. 46, p. 141-163, 1992.

KYONO, K. et al., Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracelular levansucrase and invertase. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, p. 289-293, 1995.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. **Food Biotechnology**, v. 6, p. 153-174, 1992.

LI, C. et al., Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 27-34, 2002.

LIMA, N.V.R. Investigações sobre bioatividade de polissacarídeos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil, 2001.

LINDNER, P. La importancia práctica y científica del estudio del pulque. **Rev. Mex. Biol.**, v. 6, p. 221-224, 1926.

LINDNER, P. Resultados biológicos de um viaje de estudios a México. **Investigación y Progreso**, v. 1, p. 97, 1932.

LOPES, C.A.C. et al. Efeitos obtidos com o emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* em pacientes portadores de enterocolites bacterianas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 20, p. 69-78, 1980.

LOUWS, F.J. et al. Specific genomic fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2286-2295, 1994.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J. The three ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.

MAGALHÃES NETO et al.. A utilização de carboidratos e outras substâncias nutritivas por *Zymomonas mobilis* (*Pseudomonas lindneri*), cepa Ag11 isolada em 1951. **Anais da Escola Superior de Química**, v. 1, p. 83-88, 1959.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: MORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. **Methods in Microbiology**. 1972. v. 7A. p. 315-422.

METHA, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; ROSATO, Y.B. Assesment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and the 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 53-59, 2001.

MIRANDA, C.M.S et al. Purification and partial characterization of a bacteriocin isolated from *Bacteroides ovatus* H47. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 169-174, 1993.

MOSSIE, K.G et al. Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.16, p. 724-730, 1979.

NISSEN-MEYER, J. et al. Association of the Lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. **Journal Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 1503-1509, 1993.

NOMURA, M. Colicins and related bacteriocins. **Annual Review of Microbiology**, v. 21, p. 257-283, 1967.

O'MULLAN, P.; SZAKACS-DOBOZI, M.; EVELEIGH, D.E. Identification of the saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.13, p. 137-141, 1991.

OLIVEIRA, A.A.P et al. Bacteriocin production from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and of marmosets. **Res. Microbiology**, v. 149, p. 585-594, 1998.

OLIVEIRA, V.M.; ROSATO, Y.B. *In vitro* effect of a bacteriocinogenic strain over sensitive and non-sensitive strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 162-168, 1996.

PAULA GOMES, A. Observações sobre a utilização de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kuyver & Van Niel, 1936 (*Termobacterium mobile* Lindner, 1928: *Pseudomonas lindneri* Kuyver & Hoppenbrouwers, 1931) na terapêutica humana. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.2, p.77-81, 1959.

PUGSLEY, A.P. The ins and outs of colicins. Part II: lethal action, immunity and ecological implications. **Microbiology Sciences**, v. 1: 203-205, 1984.

REEVES, P. The bacteriocins. **Bacteriology Review**, v. 29, p. 24-45, 1965.

ROGERS, P.L.; LEE, K.J.; TRIBE, D.E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 1, p. 165-170, 1979.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**, 2ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, J.F.M. et al. Efeito da cultura de *Zymomonas mobilis* em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, n.MB-118, 2001, Foz do Iguaçu, **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001, p. 230.

SCHUMACHER, I.E.; AMORIN, F.T.P.; CAETANO, M.N.P. *Zymomonas mobilis* I- ensaio de antibiose frente a 15 cepas de *S. aureus* multirresistentes isoladas no Recife. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, n.MH-240, 1997, Rio de Janeiro, **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, p. 100.

SILVA, J.M. Caracterização molecular de linhagens selvagens de *Zymomonas mobilis* (Ag11 e ZAP) e suas recombinantes. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil, 2000.

SONG, K.B.; JOO, H.K.; RHEE, S.K. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1173, p. 320-324, 1993.

SONG, K.B. et al. Nucleotide and derived amino acid sequences of an extracellular sucrase gene (*inv B*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1219, p. 163-166, 1994.

SOUTHERN, J.A; KATZ, W; WOODS, D.R. Purification and properties of a cell-bound bacteriocin from a *Bacteroides fragilis* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.25, p. 253-257, 1984.

SOUZA, C.; SOUZA, L.A.G. Colpitis and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var.*recifensis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 13, p. 85-87, 1973.

SPRENGER, G.A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic high way with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 301- 307, 1996.

STEINER, P. et al. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase gene in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 220, p. 31-38, 1998.

STEVENS, K.A. et al. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p.3613-3615. 1991.

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

TAGG, J.R; DAJANI, A.S; WANNAMAKER, L.M. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. **Bacteriology Review**, v.40, p. 722-756, 1976.

TAKADA, K.; HIRASAWA, M.; IKEDA, T. Isolation and purification of bacteriocin from *Prevotella intermedia* (*Bacteroides intermedius*). **Journal of Periodontology**, v. 62, p. 439-444, 1991.

TAN, C.C.K.; ROGERS, P.L. Bacteriocin production by *Zymomonas mobilis*. December de 2000. In: 22nd Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals. Capturado em 20 de Janeiro de 2002. On line. Disponível na Internet: http://www.ct.ornl.gov/symposium/22nd/index_files/poster02.20.htm

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Review**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TEANPAISAN, R.; BAXTER, A.M.; DOUGLAS, C.W.I. Production and sensitivity of bacteriocin-like activity among *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Pr. Nigrescens* strains isolated from periodontal sites. **Journal Med. Microbiology**, v. 47, p. 585-589, 1998.

TONOMURA, K. et al. Occurrence of plasmid in *Zymomonas mobilis*. **Agric.Biol.Chem, Biochimica et Biophysica Acta**, v. 46, p. 2851-2853, 1982.

TURNER, J.W.; JORDAN, H.V. Bacteriocin-like activity within the genus *Actinomyces*. **J. Dent. Res.**, v. 60, p. 1000-1007, 1981.

VAN BELKUM, M.J. et al. Organization and nucleotide séquense of two lactococcal bacteriocin operons. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 492-498, 1991.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1677-1687, 1991.

WANICK, M.C. et al. Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* (LINDNER, 1928), KLUYVER & VAN NIEL (1936). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 10, p. 47-50, 1970.

WANICK, M.C. Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, p. 69-71, 1971.

WEISER, P.; KRAMER, R.; SPRENGER, G.A. Expression of the *Escherichia coli* *pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as selective marker. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4155-4161, 1996.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YABLONSKY, M.D. et al. *Zymomonas mobilis* CP4: a clarification of strains via plasmid profile. **Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 71-80, 1988.

YANASE, H. et al. Cloning, sequencing and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*. **Agric.Biol.Chem.**, v. 55, p. 1383-1390, 1991.

ZEMBRZUSKI, B. et al. Cloning, sequencing and expression of the *Zymomonas mobilis* fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 3455-3460, 1992.

9. ANEXOS

Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia

LIMA, G.M.S; ARAÚJO, J.M.; ROSATO, Y.B. Detecção e Caracterização de Bacteriocinas Produzidas por Linhagens de *Zymomonas mobilis*. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, n.MB-008, 2001, Foz do Iguaçu, **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001, p. 202.

