

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Título: "VIABILIDADE E RESISTENCIA A SAIS BILIARES DE
Lactobacillus acidophilus DE DOIS PRODUTOS
LACTEOS FERMENTADOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL".

Parecer

Este exemplar corresponde
a redação final da tese
desenvolvida por
maria aparecida
martins Rodrigues
e aprovada pela
comissão julgadora
em 08.10.93.

Maria Aparecida Martins Rodrigues ⁶¹⁸
Médica Veterinária

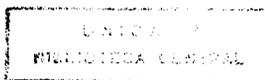
Prof^a Dr^a Débora de Queiroz Tavares ⁴
Orientadora

Prof^a Dr^a Célia Lúcia de L.F. Ferreira
Co-orientadora

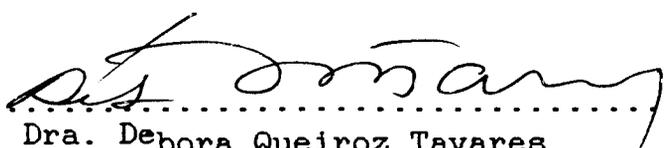
Dr. D. M. A.

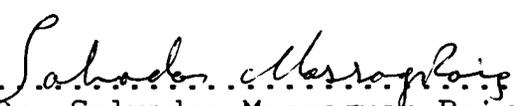
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas
1993



BANCA EXAMINADORA


.....
Prof. Dra. Debra Queiroz Tavares
(orientadora)


.....
Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(membro)


.....
Prof. Dr. José Luiz Pereira
(membro)

.....
Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
(membro)

Campinas , 08 de outubro de 1993.

A minha família e a
Wellilson,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Profa.Dra. Débora de Queiroz Tavares, pela orientação e amizade.

A Iara F. Honorio pela sua paciência e dedicação.

Aos meus amigos : Maria Izabel, Vânia, Ana Lourdes, Cláudia, Márcia, João, Elizabete, Paulo, Eliana, Ricardo, Maria Auxiliadora, Ana Maria, Alice , Izildinha, Raquel e Luciane.

Ao Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira, por ser um grande mestre e amigo.

Ao Prof. Walter Azevêdo Carvalho.

As secretárias Cidinha e Creusa.

A Empresa HA-LA do Brasil.

Ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Uberlândia.

A ABIA, pelos exemplares da tese.

INDICE GERAL

	Pag.
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRAFICA	
2.1.PROBIOTICOS.....	3
2.2.ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO.....	8
2.3.RESISTENCIA AOS SAIS BILIARES E COLONIZAÇÃO INTESTINAL.....	12
2.4.MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	14
2.5.MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSAO (MET) E VARREDURA (MEV).....	18
3.MATERIAIS E METODOS	
3.1.MATERIAIS	
3.1.1.ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO.....	22
3.1.2.CRESCIMENTO EM SAIS BILIARES.....	23
3.1.3.OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA..	24
3.1.4.OBSERVAÇÃO ESTRUTURAL AO MICROSCOPIO ELETRONICO DE VARREDURA (MEV).....	24
3.1.5.ESTUDO ESTRUTURAL AO MICROSCOPIO ELETRONICO DE TRANSMISSAO (MET).....	25
3.2.METODOS	
3.2.1.ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO.....	25
3.2.2.AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM SAIS BILIARES...	27
3.2.3.OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA..	27
3.2.4.OBSERVAÇÃO ESTRUTURAL AO MICROSCOPIO ELETRONICO DE VARREDURA (MEV).....	29
3.2.5.ESTUDO ESTRUTURAL AO MICROSCOPIO ELETRONICO DE TRANSMISSAO.....	29
3.2.6.TESTE DE COLONIZAÇÃO EM RATOS SPF.....	30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO , ENUMERAÇÃO E MEDIDA DA ACIDEZ	
4.1.1. ISOLAMENTO.....	31
4.1.2. pH E ACIDEZ TITULAVEL.....	32
4.1.3. ENUMERAÇÃO.....	32
4.2. RESISTENCIA AOS SAIS BILIARES.....	35
4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	
4.3.1. AS PREPARAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	43
4.3.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	44
4.4. MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV).....	48
4.4.1. A PAREDE CELULAR AO MEV.....	49
4.5. MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	50
4.6. ENSAIO DE ALIMENTAÇÃO COM PROBIOTICOS EM RATOS SPF.....	53
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	65

RESUMO

Os *Lactobacillus acidophilus* veiculados nos leites fermentados comercializados no Brasil⁽¹⁾ foram isolados, cultivados e quantificados. Foi também analisada a cepa CH2⁽²⁾, comercializada para as firmas produtoras dos probióticos. Para efeito comparativo acrescentou-se ao estudo a cepa NCFM⁽³⁾ e NCFM"L"⁽⁴⁾ que se caracterizam pela produção de bacteriocinas e pela resistência aos sais biliares.

Na contagem total em placa os *L. acidophilus* dos produtos novos ou armazenados mostraram sobrevivência adequada com 10^8 ufc/g de produto, quantidade estipulada para colonizadores intestinais. Nos testes de resistência aos sais biliares, os *L. acidophilus* com melhor desempenho foram os isolados do produto Biovita.

No estudo ao Microscópio Óptico de Fluorescência demonstrou-se que, embora os lactobacilos sobrevivessem na presença dos sais biliares, eles eram gradualmente afetados porque demonstraram perda de atividade metabólica, diminuição de diâmetro, e alongamento em cadeia das células.

Sob Microscopia Eletrônica de Varredura demonstraram-se as colônias ativas e as deformações de parede oriundas possivelmente das condições experimentais impostas às células. Na Microscopia Eletrônica de Transmissão resolveram-se as questões pertinentes à parede externa das células: as cepas não diferem morfológicamente entre si mas o tratamento com sais biliares diminuiu a extensão da camada externa das células constituída de proteínas e polissacárides as quais entre outras funções deveriam exercer o reconhecimento dos bacilos com substratos específicos.

A administração de *L. acidophilus* oriundos de "Bio" e "Biovita" a ratos machos Wistar SPF (Specific Pathogen Free) não resultou em colonização do jejuno e íleo dos animais embora os produtos promovessem boa aceitação e ganho ponderal.

(1) Refere-se aos produtos "Bio" e "Biovita" que são produtos lácteos fermentados por cultura mista de *L. acidophilus*, *Streptococcus spp* e *Bifidobacterium spp*. "Bio" é produto da Indústria Danone, São Paulo, S.P. e "Biovita" é produto da Indústria Nestlé, Araras, S.P.

(2) CH2 é cepa comercializada pela HA-LA do Brasil Chr. Hansen Ind. & Co. Ltda. Cx. P. 371, Valinhos, S.P.

(3) NCFM: Originária do Animal Science Department, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA, foi cedida pela Profa. Célia Lúcia de L.F.Ferreira do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, M.G.

(4) NCFM"L": Isolada de intestino humano pela Profa. Dra. Célia L.de L.F.Ferreira.

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus carried in probiotic brazilian products⁽¹⁾ were isolated, cultivated and quantified. Another two cultures were added to analysis: CH2 a commercial culture⁽²⁾, NCFM⁽³⁾ and NCFM"L"⁽⁴⁾ a culture that produces bacteriocins and has bile salts resistance.

The total count plate of *L. acidophilus* isolated from fresh products or during storage demonstrated a suitable value of 10^8 cfu/g, enough to be considered as intestinal colonizer.

Biovita product beared the most resisting *L. acidophilus* to bile salts. Fluorescence microscopy demonstrated that the cells lost its ordinary morfology and were progressively inactivated by bile salts.

The morfology were analysed under Scanning Electron Microscopy: in the absense of bile salts the cells had normal partition and were turgids; distortion of cell wall ocurred otherwise. The velvet appearance of cell wall under Transmission Electron Microscopy, whose protein-glicosidic nature is considered essential to cell recognition was almost lost when bile salts were added.

Biological dietary assay whith Wistar SPF (Specific Pathogen Free) rats did not result in colonization of the small intestine by *L. acidophilus* from the commercial products.

(1) "Bio" and "Biovita" are probiotic brazilian trade marks from Danone Ind. & Co and Nestlé respectively.

(2) CH2 was obtained from HA-LA Ind. & Co of the Brazil.

(3) NCFM: originated from Am.Sci.Dep., Oklahoma State University was received from Dra. Célia L.Ferreira, D.T.A., U.F.V., Viçosa, M.G.

(4) NCFM"L": isolated by Profa. Dra. Célia L.L.F.Ferreira.

INDICE DE FIGURAS

- FOTO 1: Lactobacilos amostrados do produto comercial Bio contrastados com Calcofluor e observados sob excitação de radiação de 244 nm e emissão média de 410 nm; (630x).....55
- FOTO 2: Células vivas (laranja) e inativas (verde) obtidas do produto comercial Bio coradas com AO e observadas sob excitação de radiação de 247 nm e emissão média de 510 nm (630x).....55
- FOTO 3: Células vivas (laranja) e inativas (verde) obtidas do produto comercial Bio coradas com AO (630x)...55
- FOTO 4: Células vivas (laranja) e inativas (verde) obtidas do produto comercial Biovita coradas com AO (630x).
.....55
- FOTO 5: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 0,15% de sais biliares e corado com AO. Elongamento das células inativas (verdes), mas apresentando individualização das células, sobretudo nas ativas (630x).....56
- FOTO 6: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 0,3% de sais biliares e corado com AO. Elongamento progressivo das células inativas. A seta / indica células mortas e a seta / indica células ativas (630x).....56

- FOTO 7: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Biovita (cultura BV) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares e corado com AO. Embora a caseína remanescente esteja fluorescendo, a resistência da cultura aos sais biliares é evidenciada (630x).....56
- FOTO 8: Colônia de *Lactobacillus acidophilus* isolada do produto comercial Bio cultivada em meio MRS agarizado com 0,15% de sais biliares observada ao MEV a 20 KV. A micrografia apresenta a forma característica que possui a colônia em crescimento de superfície (750x).....57
- FOTO 9: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio cultivado em meio MRS agarizado com 0,15% de sais biliares observado ao MEV a 30 KV. Ocorre a alongação decorrente da presença dos sais biliares (1500x).....57
- FOTO 10: Lactobacilos e estreptococos contidos no produto comercial Bio observados ao MEV a 15 KV. A formação grumosa no canto superior esquerdo é caseína (7000x).....58
- FOTO 11: Lactobacilos e estreptococos contidos no produto comercial Biovita observados ao MEV a 15 KV (3600x).....58
- FOTO 12: Produto Bio observado ao MEV a 25 KV. Brotamentos cuja origem e significado não estão esclarecidos (15000x).....58

- FOTO 13: Produto Biovita observado ao MEV a 25 KV. Observar que os brotamentos relacionam os estreptococos e os lactobacilos entre si (15000x).....58
- FOTO 14: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Biovita (cultura BV) cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. A aparência normal das células está relacionada ao crescimento em caldo e a ausência de sais biliares (5100x).....59
- FOTO 15: *Lactobacillus acidophilus* NCFM"L" cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. Embora as células apresentem um turgor adequado esta cultura apresenta um início de resistência à individualização das células (5100x).....59
- FOTO 16: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Biovita (cultura BV) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. É evidente a resistência das células aos sais biliares (5100x).....59
- FOTO 17: *Lactobacillus acidophilus* NCFM"L" cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. Comparar com a micrografia número 15: NCFM"L" é resistente a 1,0% de sais biliares (5100x).....59
- FOTO 18: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. Notar normalidade e turgor das células (3500x).....60

- FOTO 19: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. Neste campo as células não túrgidas devem estar inativas (3500x).....60
- FOTO 20: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. São evidenciadas numerosas células em autó-lise (3500x).....60
- FOTO 21: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. A mesma observação se aplica: numerosas células em autólise (5100x).....60
- FOTO 22: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em meio MRS agarizado, incluído em Epon e contrastado com acetato de uranila, observado ao MET (20000x). No-tar as fímbrias da parede celular (\).....61
- FOTO 23: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em meio MRS agarizado, incluído em Epon e contrastado com acetato de uranila, observado ao MET (9460x), onde as fímbrias estão evidenciadas (/).....61
- FOTO 24: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 0,3% de sais biliares, contrastado com PTA, observado ao

MET (20000x). Notar a presença da camada externa.
.....61

FOTO 25: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares, contrastado com PTA, observado ao MET (4320x). Notar a ausência da camada externa.
.....61

FOTO 26: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares, contrastado com PTA, observado ao MET (20000x). Notar a ausência da camada externa.
.....61

FOTO 27: Ilustrando a adesão de bactérias desconhecidas sobre a superfície dos enterócitos de ratos que não receberam *L. acidophilus*. Notar a emissão e adesão de extensos prolongamentos das bactérias sobre a mucosa intestinal ao MEV a 20 KV (4600x).....62

FOTO 28: Perfil de enterócitos normais de rato que recebeu *L. acidophilus* na dieta. Evidencia-se uma área com ruptura mecânica da vilosidade demonstrando enterócitos com morfologia normal e superfície intacta de microvilosidades. Estes ratos não demonstraram as bactérias da foto 27, mas também não possuíam *L. acidophilus* colonizadores.MEV a 20 KV (1600x)...62

1. INTRODUÇÃO

Lactobacillus acidophilus tem sido utilizado na elaboração de produtos lácteos fermentados e faz parte do grupo dos "probióticos", ou seja, são constituídos por inóculos de origem intestinal (DALY , 1991 ; GUYOT , 1990).

Atribuem-se numerosos desempenhos ao *L. acidophilus* , como antagonismo aos microrganismos indesejáveis, particularmente as bactérias patogênicas, controle das diarreias, redução dos níveis séricos do colesterol, degradação de nitrosaminas e produção da enzima *B*-galactosidase em leites fermentados (GILLILAND , 1979 ; GILLILAND & WALKER , 1990 ; KIM & GILLILAND , 1983 ; KING-THOM & STEVENS Jr. , 1992).

Quanto a permanência de *L. acidophilus* no trato digestivo, há evidências que demonstram a sobrevivência através do meio gástrico e colonização na porção terminal do intestino delgado, predominando numericamente no intestino grosso nas várias espécies animais (SKINNER & CARR , 1974). A fixação se assemelha a um mecanismo de aderência bastante seletivo, sendo provável que as cepas mais aderentes sejam aquelas que apresentam um envoltório externo à membrana celular de natureza polissacarídica (HERALD & ZOTTOLA , 1988; HOOD & ZOTTOLA , 1987). Para que isso ocorra, as cepas devem ser resistentes aos sais biliares, suco gástrico e à lisozima.

No Brasil , com o advento dos alimentos "probióticos" *L. acidophilus* está sendo incorporado a produtos tipo "leites fermentados". Na tentativa de ampliar o consumo, é apresentado sobre forma saborizada. Devido a

crescente evidência de que *L. acidophilus* e *Bifidobacterium spp* fazem parte de um grupo aceito como adjuvante dietário, os leites fermentados são enriquecidos com estes microrganismos. As características dos produtos obtidos dependerão da atividade metabólica, da velocidade de crescimento, da quantidade de ácido láctico produzida e das condições de propagação intestinal mantidas pelos inóculos.

E de conhecimento que *L. acidophilus* quando incorporado ao iogurte decai em número durante a estocagem refrigerada (GILLILAND & SPECK , 1977c). Torna-se então oportuno verificar se o mesmo efeito de inviabilização estaria ocorrendo nos demais leites fermentados. A questão numérica é capital, desde que os efeitos benéficos de *L. acidophilus* são observados quando se atinge um consumo diário de 10^8 a 10^9 células por grama do produto.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a presença de *L. acidophilus* nos leites fermentados (Bio e Biovita) e avaliar sua capacidade de manter-se viável, em número suficiente, nas condições de armazenamento das prateleiras comerciais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PROBIÓTICOS

Segundo ROGINSKI (1988) probiótico é um produto fermentado contendo microrganismos viáveis que atuam favoravelmente no lumen intestinal. A sobrevivência do probiótico no intestino está relacionada a capacidade de resistir aos mecanismos antibacterianos. As características de um bom probiótico são as seguintes : conter em número suficiente microrganismos capazes de sobreviver e aderir à mucosa intestinal, resistir a valores baixos de pH, aos sais biliares e aos fatores antimicrobianos existentes no trato gastrointestinal.

As espécies frequentemente adicionadas aos probióticos são *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. bifidus*. Para GILLILAND (1979), uma das mais importantes propriedades das culturas lácticas utilizadas como adjuvantes dietários é a sobrevivência em número adequado durante o período de estocagem.

Os grupos mais utilizados para a elaboração dos probióticos são estreptococos e lactobacilos. As espécies mais comuns são : *L. acidophilus*, *L. casei* , *L. helveticus* , *L. lactis* , *L. salivarius* , *L. plantarum* , *Bifidobacterium sp* , *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. São cepas de origem intestinal, exceto as duas últimas citadas que fazem parte dos iogurtes. Embora isolados do trato intestinal, as condições originais de convivência dos lactobacilos são bastante complexas porque a microbiota natural dos intestinos é constituída por uma variedade de microrganismos da ordem de 10^{14} por grama de fezes (FULLER , 1989).

GUYOT (1990) relatou que , desde 1984 na Europa Ocidental, leites fermentados são produzidos contendo as espécies *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus acidophilus* por grama do produto. Em 1986 surgiu um produto adicionado de bifidus ativos, com a finalidade de veicular 10^7 a 10^8 bifidobactérias por grama. Esses novos leites fermentados surgiram muito tempo depois dos iogurtes tradicionais, inoculados com *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* , os quais não possuem capacidade de fixação na mucosa intestinal. Imaginou-se então um produto capaz de sobreviver e se implantar no trato gastrointestinal, como as cepas *L. acidophilus* e *Bifidobacterium spp* (FULLER , 1986). A espécie *Bacillus bifidus* foi isolada de fezes de crianças por Tissier em 1899 (GUYOT, 1990). A morfologia pode variar nas formas V ou Y de acordo com o meio de crescimento. Durante muito tempo foi considerado como parte do gênero *Lactobacillus* , até que em 1957 caracterizou-se o gênero *Bifidobacterium*, compreendido por vinte e cinco espécies. As espécies variam de acordo com o tipo de alimentação, sendo que crianças alimentadas com leite materno eliminam nas fezes até 10^{10} *Bifidobacterium* por grama. A espécie *Bifidobacterium longum* é uma das mais utilizadas pelas indústrias, porém sobrevivem mal a valores de pH abaixo de 5.5 no produto final; valores de pH abaixo de 4.5 são desfavoráveis ao desenvolvimento de *Bifidobacterium bifidus*. *Lactobacillus acidophilus* foi descrito por MORO em 1900, igualmente isolado de crianças (GILLILAND et alii , 1975). A acidez dos leites fermentados por *L. acidophilus* é considerada relativamente baixa, em torno de 0.7% de ácido láctico, produzindo sabor e aroma agradável e suave (BUCHANAN & GIBBONS , 1974).

No final do processo de fabricação quantidades mínimas de 10^6 a 10^8 *Bifidobacterium* e/ou *L. acidophilus* por ml devem estar presentes (FULLER , 1986).

A fermentação do leite por *L. acidophilus* , *Bifidobacterium* e *S. salivarius subsp. thermophilus* dá bons resultados na medida em que a conservação do produto a 5° C permite que permaneça com sabor doce e suave e mantenha as características de frescor, qualidades terapêuticas e bom estado de conservação até tres semanas (FULLER , 1989).

Os prováveis mecanismos responsáveis pela ação das bactérias lácticas no intestino foram descritos por KIM & GILLILAND em 1983, e se resumem no seguinte : 1- ação antagônica às bactérias produtoras de gases; 2- fonte suplementar de lactase no intestino; 3- aumento da resposta imune; 4- atividade anticarcinogênica ; 5- capacidade hipocolesterolemiantes.

Segundo DALY (1991) , os efeitos benéficos causados pelas bactérias lácticas colonizadoras do trato intestinal podem estar relacionados com o :

1- Controle de microrganismos patogênicos : *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*,

Vibrio, entre outros. Esse controle pode ser devido a interação de alguns fatores dos quais o ácido láctico e acético e a produção de substâncias antibióticas. *Lactobacillus acidophilus* produz bacteriocinas e peróxido de hidrogênio , que inibem uma variedade de bactérias.

A cepa de *L. acidophilus* NCFM , quando mantida a pH 6.0 em caldo MRS, parece exibir morte prematura após 12 horas de crescimento. Entretanto, durante um período maior de incubação a cultura reinicia seu crescimento.

Essa aparente morte é devida a presença de cepas produtoras de bacteriocinas na cultura (FERREIRA & GILLILAND , 1988).

2- Ainda segundo DALY (loc cit), ocorrerá um aumento da utilização da lactose . Os termos "intolerância à lactose" e "má digestão" são usados para definir condições inadequadas de absorção da lactose no intestino. O autor cita a alta incidência nas populações da Africa , Asia e E.E.U.U..A ausência de quantidades suficientes da enzima *B*-galactosidase no intestino delgado causa flatulência, diarréia e desconforto abdominal. Nos leites fermentados em geral, a lactose é hidrolizada pela enzima *B*-galactosidase situada no interior das células bacterianas das culturas lácticas.

De acordo com PERDIGON et alii (1990), as infecções gastrointestinais são problemáticas sobretudo quando se tratam de crianças prematuras. A administração de *L. casei* e *L. acidophilus* auxilia no combate a infecções causadas por *Salmonella typhimurium* .

A administração oral de *Lactobacillus acidophilus* aumenta a ativação de macrófagos e linfócitos quando comparado à espécie *S. thermophilus*, que demonstra menor atividade, provavelmente por não fazer parte da microbiota intestinal. PERDIGON et alii (1987) sugere que desta ativação participem os mecanismos imunes do intestino os quais auxiliariam a sobrevivência das bactérias lácticas. Mais recentemente, HUIS in't Veld & HAVENAAR (1991) observaram que as bactérias intestinais ou seus antígenos podem atravessar a barreira do epitélio intestinal, estimulando a diferenciação de linfócitos e a atividade fagocitária.

Os compostos azo são corantes formados por amins diazotadas, bastante utilizados em alimentos. Esses corantes hidrosolúveis chegam ao trato gastrointestinal através da via oral ou por outros meios, e há evidências de que são metabolizados pela microflora intestinal. Os efeitos tóxicos e/ou cancerígenos dos compostos azo podem ser devidos a redução dos mesmos, produzindo amins aromáticas. Apesar de não serem citotóxicos, mutagênicos ou cancerígenos, alguns estudos revelam que azoredutases produzidas pela microflora intestinal liberam amins aromáticas como a benzidina, que induzem câncer nas vias urinárias do homem e a formação de tumores em animais. Uma dieta suplementada com *L. acidophilus* diminui significativamente a atividade das azoredutases nas fezes. Além disso, *L. acidophilus* reduz os níveis das enzimas *B*-glucosidase, *B*-glucuronidase, nitroredutase e azoredutase, considerados fatores cancerígenos (KING-THON CHUNG & STEVENS, 1992).

SARRA et alii (1991) determinaram as seguintes condições para a administração de *L. acidophilus*: 1- especificidade do hospedeiro ao microrganismo utilizado; 2- capacidade adequada da cepa de formar populações estáveis no trato gastrointestinal.

Finalmente, com respeito à redução da taxa de colesterol sanguíneo, ou especificamente, das lipoproteínas de baixa densidade, MANN & SPOERRY (1974) observaram que a ingestão de grandes quantidades de leites fermentados reduz o colesterol sérico e a partir daí propuzeram a existência de um "fator" denominado hidroximetilglutarato (HMG), porém sua presença no leite não foi demonstrada.

Os autores também citam que compostos como o ácido orótico , ácido úrico , e compostos produzidos por bactérias são considerados como hipocolesterolemiantes. GILLILAND et alii (1985), também sugerem que o consumo de certos produtos lácteos fermentados resultam em diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo, devido à presença do ácido hidroximetilglutárico no leite (GRUNEWALD , 1982). Em 1977a, GILLILAND & SPECK observaram a desconjugação de sais biliares por *L. acidophilus* in vitro e sugeriram que o aumento na excreção de ácidos biliares poderia acelerar o catabolismo do colesterol a ácidos biliares. Demonstraram também que *L. acidophilus* , quando em condições adequadas , é capaz de incorporar esteróides na estrutura celular. Entretanto, uma cepa considerada altamente bile-tolerante pode não apresentar capacidade de assimilar colesterol.

Em resumo, uma cultura de origem humana que assimile colesterol, cresça bem na presença de bile e produza bacteriocinas, pode ser selecionada para uso em adjuvantes dietários (GILLILAND & WALKER , 1990).

2.2. ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus*

BUCHANAN & GIBBONS (1974) caracterizaram *L. acidophilus* como lactobacilos , originalmente isolados de fezes de crianças , lábios e canal vaginal de adultos e de animais. São bacilos classificados como homofermentativos, que produzem D-L- ácido láctico de 0,7 a 1,0% , possuem dimensões de 0,6 a 0,9 μm por 1,5 a 6,0 μm , ocorrem isoladamente , em pares ou cadeias curtas , e são imóveis. Formam colônias lisas ou rugosas , e de acordo com o meio emitem projeções filamentosas (RICHARDSON , 1985).

Não cresce a 15° C e pode crescer até 45° C (valor ótimo 37°C) a um pH inicial de 5.0 a 7.0 (pH ótimo 5.5 a 6.0). Além disso, *L. acidophilus* é catalase negativo , reage positivamente a coloração de Gram e fermenta os seguintes carboidratos : celubiose, lactose, maltose, trealose, sacarose, galactose, glicose e outros; não fermenta sorbitol e manitol (GILLILAND & SPECK, 1977d).

Uma das principais características de *L. acidophilus* e de outros microrganismos intestinais, e que foi estudada por GILLILAND & SPECK (1977a) é a resistência a sais biliares. ROGOSA & SHARPE (1959) desenvolveram um meio seletivo para isolamento e enumeração de lactobacilos em fezes. A seguir, uma forma desidratada daquele meio foi desenvolvida, o meio LBS.

Para enriquecimento, isolamento e cultivo de lactobacilos muitos outros meios foram propostos. Porém, o meio ROGOSA & SHARPE contém alto teor de acetato e pH relativamente baixo, tornando-se seletivo e particularmente adequado ao isolamento e contagem de lactobacilos em amostras cuja microbiota apresenta outros grupos microbianos , tais como enterobactérias. Todas as cepas de *L. acidophilus* crescem bem nos meios LBS, LBSO (com "oxgall") , adicionados de sais biliares ou "oxgall" nas concentrações de 0.15% e 0.20% (COLLINS , 1978) e no meio LAPTg (CERELA , 1991). Resultados semelhantes foram obtidos para *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. fermentum*. O uso de taurocolato de sódio no lugar de "oxgall" também produz resultados comparáveis. A morfologia das células e das respectivas colônias são considerações importantes para a seleção de *L. acidophilus* como adjuvantes dietários (JOHNSON et alii, 1980).

Para KLAENHAMMER & KLEEMAN (1981) quando o crescimento era filamentososo no meio sólido, os lactobacilos formavam colônias fusiformes e irregulares com aparência rugosa, e descreveu também que colônias lisas e rugosas podiam ser detectadas simultaneamente no mesmo meio. No ano seguinte, KLAENHAMMER (1982) descreveu que as transições morfológicas entre colônias lisas e rugosas eram características dos lactobacilos, e refletiam uma resposta fenotípica durante a adaptação a diferentes meios de crescimento. Colônias rugosas parecem ser mais resistentes a sais biliares que colônias lisas.

A tolerância a bile até 1.0% pode indicar que a bactéria isolada deva ser selecionada para a elaboração dos adjuvantes dietários, porém testes relacionados a sobrevivência a valores baixos de pH e capacidade de adesão à mucosa intestinal são imprescindíveis (OVERDAHL & ZOTTOLA, 1991). De acordo com KLAENHAMMER & KLEEMAN (1981), as bactérias lácticas fazem parte de um grupo de microrganismos responsáveis pela produção de ácido láctico nos diversos produtos fermentados como leite, carne e vegetais. Análises microbiológicas de variados produtos frequentemente revelam um número reduzido de células viáveis, e pouco se tem feito no sentido de identificação das culturas inoculadas nos produtos comerciais (KLAENHAMMER, 1982; BRENNAN et alii, 1983).

Segundo SPECK (1978), "leite acidófilo" foi o primeiro produto desenvolvido com a finalidade de veicular *L. acidophilus*. Esse produto no entanto não ganhou popularidade devido ao "flavor" inadequado.

A predominância de lactobacilos no conteúdo fecal era obtida através de um consumo diário de 250 ml do leite inoculado. Esse volume deveria conter cerca de 1.0×10^{11} *L. acidophilus*. Em geral, contagens entre 1.0×10^8 e 1.0×10^9 células viáveis por ml diariamente seria suficiente para a sua manutenção nas fezes.

De acordo com GILLILAND & SPECK (1977b), outros produtos como "Biogurte" e "Biogarde" foram desenvolvidos na Europa sob as mais variadas formas. O "Biogurte" contém *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *S. salivarius subsp. thermophilus* e *L. acidophilus*; após algumas transferências, somente as duas primeiras espécies se mantiveram viáveis porém em número reduzido.

O peróxido de hidrogênio, produzido pelo *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, parece ser o principal responsável pelo antagonismo relativo ao *L. acidophilus*, embora COLLINS & ARAMAKI (1980) tenham descrito que *L. acidophilus* produz também substâncias antibióticas e peróxido de hidrogênio. O "Biogarde" designa os produtos lácteos fermentados contendo *L. acidophilus*, *S. salivarius subsp. thermophilus*, e *Bifidobacterium spp.*. As culturas são propagadas separadamente, sendo que no produto final apenas 1% do inóculo é constituído por lactobacilos e bifidobactérias (GILLILAND & SPECK, 1977b).

GILLILAND & SPECK (1977c) observaram que *L. acidophilus* quando acrescentado ao iogurte diminui em número durante a estocagem refrigerada. Esta instabilidade seria causada pela produção de peróxido de hidrogênio pelo *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

De acordo com GONZALEZ et alii (1990), leites fermentados por *L. acidophilus* e *L. casei*, em concentração no produto final de 10^7 a 10^8 microrganismos por ml, demonstraram efeitos protetores nas desordens gastrointestinais.

Em 1988, SABIONI & PINHEIRO descreveram que, embora sejam muitas as vantagens do uso de *L. acidophilus*, há limitações quanto a sua utilização na dieta humana. Isto se deve ao sabor pouco apreciado dos produtos de fermentação, à dificuldade de manutenção de *L. acidophilus* em laboratório e à obtenção de estirpes que sobrevivam no trato gastrointestinal. A produção de grande quantidade de ácido láctico é importante, pois os efeitos bacteriostático e bactericida dependem da concentração do ácido no meio. As culturas que são grandes produtoras de ácido láctico podem tornar os produtos lácteos menos palatáveis e devem ser estocadas sob refrigeração para evitar a perda da viabilidade.

2.3. RESISTENCIA AOS SAIS BILIARES E COLONIZAÇÃO INTESTINAL

Ao nascimento, o trato intestinal do homem e dos animais é isento de microrganismos. Após o segundo dia as fezes podem conter bactérias como coliformes, enterococos, lactobacilos, clostrídios, estafilococos e bifidobactérias em variadas proporções. *Bifidobacterium* prolifera rapidamente, reduzindo o número das bactérias putrefativas a níveis toleráveis e normais no intestino. De 10^{11} a 10^{14} bactérias por grama de fezes, 10^5 são lactobacilos que, na idade adulta, aumentam em número seguido de uma redução considerável de bifidobactérias. A porção terminal do intestino delgado é o principal habitat dos lactobacilos (SKINNER & CARR, 1974).

Para JUVEN et alii (1991), os seguintes fatores contribuem para o processo de colonização das bactérias no trato gastrointestinal : 1- acidez gástrica (GILLILAND , 1979) ; 2- resistência a sais biliares (GILLILAND & SPECK , 1977a; SPECK , 1976; GILLILAND et alii , 1984) ; 3- resistência ao deslocamento promovido pela peristalse e às enzimas digestivas ; 4- produção de compostos antibacterianos.

O processo de colonização intestinal depende de fatores como a motilidade das superfícies epiteliais, que modifica a carga microbiana durante a passagem dos conteúdos estomacal e intestinal (MAYRA-MAKINEN et alii , 1983). A superfície da moela das aves é revestida por espessa camada de lactobacilos aderidos às células epiteliais escamosas (FULLER , 1977; FULLER , 1978).

Lactobacillus acidophilus produz as bacteriocinas acidofilina, acidolina, lactobacilina e lactolina (SHAHANI & CHANDAN , 1979). A ação antibacteriana e inibidora dos lactobacilos no intestino é devido sobretudo a produção de ácido láctico e peróxido de hidrogênio . As bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos efeitos antagonistas que as bactérias Gram negativas. Sendo assim, a produção de ácido láctico e o conseqüente abaixamento do pH resultam em supressão da *E. coli* no epitélio intestinal (FULLER , 1977). A inibição também é favorecida por anaerobiose. O efeito bactericida do peróxido de hidrogênio pode estar relacionado a ativação do sistema lactoperoxidase do leite. Através desse sistema, o composto tiocianato na realidade seria o principal responsável pela atividade bactericida para as bactérias Gram negativas.

Segundo KLAENHAMMER (1982), a capacidade de produção de bacteriocinas pelos lactobacilos intestinais pode melhorar a capacidade de competição das cepas e

auxiliar no processo de adesão à mucosa do trato gastrointestinal. A superfície de adesão é espécie - específica e ocorre através da fixação de uma camada de polissacarídeos ácidos existentes na parede celular externa das bactérias com as células epiteliais da mucosa intestinal (KLEEMAN & KLAENHAMMER , 1982).

A desconjugação dos sais biliares é importante no controle dos microrganismos no trato gastrointestinal, sendo que os ácidos biliares desconjugados são mais inibidores que os conjugados. Os *Lactobacillus* colonizam o intestino humano com capacidade variada para desconjugar os sais glicocolato e taurocolato (JUVEN et alii, 1991).

HOOD & ZOTTOLA (1988) consideraram que os microrganismos só tem acesso aos intestinos quando ultrapassam a barreira de ácido clorídrico e enzimas digestivas do estômago, onde as bactérias entram em contato com um ambiente que apresenta valores de pH de 2,0 a 8,0.

Lactobacillus acidophilus quando incubado é capaz de sobreviver em números elevados em iogurte congelado a pH 5,4, e após exposição em ácido clorídrico 0,01 N por duas horas a 37° C (HOLCOMB et alii , 1991).

2.4.MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

A fluorescência é a luminescência de uma substância excitada por radiação de energia relativamente alta. A substância absorve e/ou converte (ex. em calor) uma parte da energia . A maior parte da energia não absorvida é emitida novamente , caracterizando o fenômeno da fluorescência .

Neste processo, a radiação fluorescente possui energia menor e comprimento de onda maior que o da radiação excitadora. Existe então uma razão inversa entre energia de radiação e comprimento de onda : os raios gama ou raios X , de comprimento de onda curto , por exemplo, penetram mais que os raios luminosos e térmicos de onda longa. Conseqüentemente, uma substância fluorescente pode ser excitada por radiação invisível próxima do UV para ser vista na faixa visível.

Há substâncias que exibem "fluorescência primária", como a clorofila, óleos e ceras. As que possuem apenas uma quantidade limitada de "auto-fluorescência" inespecífica, com luminescência branco-azulada, são proeminentes com excitação em UV e Violeta. Tais amostras devem ser coradas para que emitam "fluorescência útil" ou específica. Isso pode ser obtido com os chamados fluorocromos. Dependendo da composição química e características, os fluorocromos se ligam a áreas específicas da substância determinando a "fluorescência secundária", processo chamado de fluorocromização (MUNCK , 1989).

Há grande variedade de fluorocromos disponíveis e novos compostos estão sendo desenvolvidos. Para a visualização de microrganismos, os fluorocromos mais usados com seus respectivos filtros de excitação e comprimentos de onda estão relacionados a seguir:

Fluorocromo	Filtro/Excitação	Comp. Onda(nm)
Acridine Orange(AO)	Azul	390-450
Acriflavine(AFH)	UV/Verde	350-470
Auramine(AUR)	V/Verde	400-470
Calcofluor White(CWC)	UV	350-435
Congo Red(CR)	UV/Verde	350-470
Fluorescein Diacetate(FDA)	Azul	460-515
Fluorescein Isodiac.(FITC)	Azul	490-520
Primuline(PL)	V	400-460
Tinopal(TA)	UV	340-400

De acordo com o tipo de processamento empregado na conservação de alimentos de origem animal e vegetal, pode ocorrer separação de componentes dos tecidos e originar diferenças na estrutura física ou química. Essas diferenças, bem como a detecção de vitaminas, a análise estrutural de grãos, a morfologia de microrganismos entre outros, podem ser analisados na Microscopia de Fluorescência.

PETTIPHER et alii (1980) desenvolveram um método de filtração em membrana para Microscopia de Epifluorescência com a finalidade de enumerar as bactérias em leite cru. Após coloração da amostra com os fluorocromos

"Acridine Orange" (AO)) e "Tinopal AN" (TA), as bactérias fluorescem sob excitação com luz ultravioleta e podem ser facilmente contadas. Essa técnica é ideal para contagens em leite que contém de 5×10^3 a 5×10^8 bactérias por ml e foi denominada DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique). A leitura pode ser feita em espectrofotometria no intervalo de 455 a 490 nm . As vantagens do método DEFT são a rapidez e a possibilidade de diferenciação entre células vivas e mortas no mesmo campo, preservando as características morfológicas das bactérias (RODRIGUES & KROLL , 1985).

Segundo HOBBIÉ et alii (1977), o sucesso da contagem direta em Microscopia de Epifluorescência dependeriam de : 1- amostragem totalmente retida no filtro ; 2- superfície do filtro de fácil visualização ; e 3- coloração e condições ópticas adequadas. Os filtros de policarbonato ("Nuclepore") são mais apropriados que os de celulose ("Millipore") devido a maior regularidade dos poros, e a superfície lisa a qual retém todas as bactérias. As culturas ativas fluorescem com AO na cor vermelho-laranja por predominância de RNA no interior da estrutura celular, em contraste com a cor verde que caracteriza as células inativas, possuindo maior quantidade relativa de DNA. Na célula viva a fluorescência verde de DNA está sempre presente, porém mascarada pela grande quantidade de RNA.

Algumas considerações a respeito das interações do fluorocromo AO com os ácidos nucleicos in vivo foram feitas por BACK & KROLL (1991). As quantidades de DNA não variam muito com a razão de crescimento da célula, ao contrário dos mRNA e rRNA que aumentam consideravelmente .

Sendo assim, é provável que as diferentes fluorescências estejam relacionadas ao complexo que a AO forma com as células, às quantidades e espécies de DNA e RNA, e ao grau de desnaturação dos ácidos nucleicos. Processos de aquecimento podem alterar os resultados obtidos pela coloração de culturas com AO. Após manutenção da amostra por 30 minutos a 63° C, cocos Gram positivos aumentam a fluorescência laranja, da mesma forma que cocos Gram negativos fluorescem mais na cor verde indicando maior e menor atividade, respectivamente. A fixação de células com aldeídos não modifica os ácidos nucleicos, continuando assim a diferenciação das cores laranja e verde após a morte celular. Entretanto, as duplas ligações do DNA, após aquecimento, são quebradas a ligações simples resultando em fluorescência de cor vermelha (HILL , 1991).

2.5.MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSAO (MET) E VARREDURA (MEV)

De acordo com HOOD & ZOTTOLA (1987), as bactérias intestinais são capazes de aderir ao trato gastrointestinal através da existência de uma série de mecanismos. Os lactobacilos apresentam especificidade para tecidos epiteliais, sendo que a forma de adesão é específica para os receptores localizados na mucosa intestinal. A presença de uma camada externa de polissacarídeo pode estar envolvida no processo de aderência dos microrganismos ao tecido intestinal (ARAUJO et alii , 1986 ; BEVERIDGE , 1981 ; KLAUSNER et aii, 1987). A camada de polissacarídeo que envolve a célula de *L. acidophilus* não afeta a resistência a sais biliares. No entanto, a contrastação desta camada com

"Ruthenium Red" (RR) juntamente com teste de tolerância a 1% de sais biliares pode indicar quando a cepa de *L. acidophilus* é diferenciada e provavelmente adequada para uso em adjuvantes dietários. A existência de alguns mecanismos são necessários ao estabelecimento e manutenção da microflora na superfície do epitélio intestinal.

BROOKER & FULLER (1975) quando estudaram implantes de lactobacilos em células intestinais de aves, observaram que a parede celular externa dos lactobacilos era envolvida por um polissacarídeo ácido, o qual foi evidenciado por RR. É provável que esta diferenciação responda pela capacidade de fixação sobre a parede intestinal. A natureza da camada externa de *L. acidophilus* foi estabelecida com o auxílio de métodos que estão relacionados a duas das propriedades dos carboidratos ácidos, ou seja, a habilidade de reagir a corantes catiônicos e a de formar grupos aldeídos. A camada externa é composta de proteínas que se ligam a polissacarídeos neutros que fazem parte da parede celular, e aos peptidoglicanos ou ácido teicóico através de pontes de hidrogênio .

De acordo com o tipo de tratamento dado às células, a camada externa de polissacarídeo pode formar "fibrilas" a partir da desnaturação química e condensação durante o preparo do material para a MEV. Mais especificamente, a aparência fibrilar é atribuída a retração desigual da camada externa na fase de desidratação alcoólica (FRASER & GILMOUR , 1986; HALL, 1978). Para HERALD & ZOTTOLA (1988), algumas espécies de lactobacilos possuem capacidade de formar fibrilas semelhante ao mecanismo de aderência intestinal das espécies de *Pseudomonas*. LEWIS et alii (1987) observaram a presença de estruturas arredondadas na

superfície celular de *Pseudomonas* , e concluíram serem contaminações de resíduos proteicos ou de micelas de caseína.

HIGGINS et alii (1973) estudaram ao MEV brotamentos da parede celular de *Pseudomonas fragi* e *Micrococcus sp* e concluíram que havia também parte do citoplasma. A preparação de *Lactobacillus acidophilus* por criofratura demonstrou uma parede celular homogênea e de superfície lisa, enquanto que a visualização ao MET determinou a parede celular composta por tres camadas, e as culturas em fase de autólise apresentaram extrusões da membrana celular nos mesmos locais de invaginações da parede.

Para BRENNAN et alii (1986), *L. acidophilus* quando submetido a secagens a vácuo e a frio torna-se sensível a sais biliares e lisozima, provavelmente devido a lesões ocorridas na parede celular.

Existem diversos parâmetros de crescimento celular que influenciam a síntese da superfície proteica em *L. acidophilus*. Condições de crescimento a 45° C e em meio contendo sais biliares podem reduzir as quantidades do material proteico externo (BHOWMIK et alii , 1985); a redução é mais intensa quanto maior a concentração de sais biliares.

Em 1991, OVERDAHL & ZOTTOLA estudaram *L. acidophilus* frente a valores de pH 3 e 4, e concluíram que a espécie pode sobreviver sem que haja alterações na sua capacidade de aderência às células da mucosa intestinal. O processo de aderência é provável que esteja relacionado à quantidade de polissacarídeos envolvendo a célula. As cepas que não possuem aquela camada também não são capazes de aderir às células intestinais. No entanto, a presença de uma

camada espessa de polissacarídeo não afeta a resistência a bile (HOOD & ZOTTOLA , 1988).

De acordo com BARROW et alii (1980), grande número de lactobacilos e estreptococos tem sido caracterizados como intimamente associados a região esofágica do estômago de suínos (FULLER et alii , 1978). O ácido láctico produzido por aqueles microrganismos determina o pH antes mesmo de iniciar a secreção de ácido clorídrico no estômago, controlando assim o crescimento de *E. coli* em suínos desde o segundo dia de idade .

Estudos realizados através de ME demonstraram que células de lactobacilos e estreptococos possuem camadas extracelulares quando coradas com RR. Essas mesmas camadas contêm fibrilas que se prolongam da parede celular até a superfície do epitélio intestinal (HANDLEY et alii , 1988 ; HARTY & HANDLEY , 1989).

A presença de uma camada proteica externa nas cepas de *L. acidophilus* é de grande interesse para as interações ocorridas no ecossistema do trato digestivo. A superfície celular é resistente a hidrólise de enzimas proteolíticas, e tem função protetora à célula. Há evidências de que *L. acidophilus* apresenta um alto grau de hidrofobicidade e essa característica estaria associada ao fenômeno de aderência, porém depende da superfície proteica (BHOWMIK et alii, 1985).

Para SHARON & LIS (1993) a adesão bacteriana está relacionada ao reconhecimento celular, e as proteínas associadas aos carboidratos se identificam como os marcadores primários do reconhecimento celular.

3.MATERIAIS E METODOS

3.1.MATERIAIS

3.1.1.ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO

Leites fermentados (Bio e Biovita)* foram amostrados de prateleiras comerciais no período de 12/04/91 a 01/10/92, totalizando 36 amostras. Do total, 12 amostras eram recém-fabricadas e foram armazenadas a 5° C durante trinta dias para que fossem utilizadas como controle.

O meio de cultura usado para o isolamento e enumeração de *L. acidophilus* dos produtos foi o caldo MRS (MERCK 10661), 37° C e pH 6.5 por 72 horas (BRENNAN et alii, 1983; GILLILAND & SPECK , 1977b). Além disso, o meio sólido LAPTg formulado foi usado com a finalidade de comparar o tempo de crescimento com o meio sólido MRS (CERELA, 1991). O meio LAPTg é constituído por extrato de levedura 10g; peptona 15g; triptona 10g; glicose 10g; tween 80 1 ml; água destilada 1 l e agar 1,5% (pH final 6,8).

As amostras foram analisadas quanto ao pH e a acidez (grau Dornic) foi determinada por titulação com hidróxido de sódio 0,11 N (RICHARDSON , 1985).

3.1.2.CRESCIMENTO EM SAIS BILIARES

Para avaliar a resistência aos sais biliares, as cepas isoladas dos produtos comerciais foram submetidas a

concentrações crescentes de Bacto Oxgall (DIFCO), constituído de bile bovina.

Culturas puras de *L. acidophilus* CH2, NCFM e NCFM"L" foram usadas como controle de cepas resistentes. A cultura liofilizada CH2 é constituída de cepas de *L. acidophilus* isoladas do intestino humano e foram fornecidas pela empresa HA-LA do Brasil. São utilizadas na produção de leites fermentados, associadas a outras culturas lácticas. *Lactobacillus acidophilus* NCFM é uma cultura mista de origem intestinal humana, resistente a sais biliares e formada por cepas produtoras de bacteriocinas; NCFM"L" é também de origem humana, e resistente a sais biliares (FERREIRA & GILLILAND , 1988).

Foram feitas curvas de crescimento em caldo MRS e MRS adicionado de sais biliares nas concentrações de 0,30 % e 0,60 %. Os meios assim preparados foram esterilizados a 121° C por 15 minutos em autoclave e mantidos a 37° C até o momento de serem inoculados. O crescimento durante 8 horas a 37° C, em banho-maria , foi monitorado através do Espectrofotômetro Digital (MICRONAL , modelo B 34211). As curvas foram comparadas à curva padrão da cepa CH2 fornecida pela Empresa HA-LA .

3.1.3.MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Como suporte das amostras foram utilizadas membranas de policarbonato "Nuclepore" (Nuclepore Corporation - porosidade aproximada de 0.20 μ m de diâmetro . A fluorescência das membranas foi reduzida por impregnação

com o pigmento "negro ácido" ou Irgalan Black 107 (CIBA GEIGY) a 0,20 % em ácido acético comercial. As membranas foram imersas nessa solução à temperatura ambiente, em frasco escuro, por 48 horas no mínimo ou até atingir coloração azul clara (HILL , 1991; HOBBIE et alii, 1977).

3.1.4.MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV)

Com a finalidade de aprofundar a análise e comparar resultados, as amostras preparadas anteriormente para a Microscopia de Fluorescência foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,1 M com Ruthenium Red (RR) 500 ppm por duas horas a 4° C, seguido de desidratação alcoólica em concentrações crescentes de álcool. As amostras sempre apoiadas sobre as membranas foram a seguir desidratadas no aparelho de secagem em ponto crítico (Critical Point Drying - BALZERS, modelo CPD 030), tendo-se empregado o CO₂ como gás e pressão entre 80 e 90 atmosferas. As membranas foram colocadas sobre suportes metálicos cilíndricos e a seguir metalizadas. A metalização foi feita a vácuo com carbono e ouro em aparelhos de vaporização iônica tipo "Sputter", e a observação ao Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL T-300). O RR sobre a superfície das bactérias facilitava a identificação da face superior das membranas.

3.1.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A camada externa da parede celular de *L. acidophilus* foi também estudada através das técnicas de inclusão em Epon e por coloração negativa com ácido fosfotúngstico (PTA). A primeira fixou, desidratou e incluiu na mistura Epon:Araldite a cultura CH2 cultivada em agar MRS, segundo as técnicas de rotina (HALL, 1978). Na técnica de coloração negativa, as culturas CH2 e os isolados do produto Bio (BI) adicionados de 0,30% e 1,0% de sais biliares foram fixadas com PTA 1,0% (ARAÚJO et alii, 1986; HERALD & ZOTTOLA, 1988) e observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (ZEISS EM 9S2).

3.1.6. TESTE DE COLONIZAÇÃO EM RATOS SPF

Os produtos Bio e Biovita foram administrados em ratos provenientes do Biotério Central da Unicamp. Foram escolhidas duas dietas como veículos dos produtos: uma dieta foi a ração Nuvilab CR₁ da Nuvital Ind. e Co. de Curitiba, PR., e a seguinte foi a dieta à base de caseína à 18% e formulada segundo se encontra na literatura para AIN 76 (American Institute of Nutrition, 1977).

Os animais foram acomodados em gaiolas individuais, a ração renovada diariamente e as fezes observadas quanto a consistência. A temperatura ambiente era estável em 21°C, o período de claro-escuro era de 12 horas e a umidade relativa era aproximadamente de 68%.

3.2. METODOS

3.2.1. ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO

Os produtos lácteos fermentados comercializados no

Brasil, classificados como probióticos ou seja, veiculam bactérias intestinais, são compostos por cultivos mistos de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp* e *Streptococcus spp*. (GUYOT, 1990; ROGINSKI, 1988). São cultivos termofílicos, exigindo temperaturas de crescimento entre 30°C e 45°C. A fermentação produzida é ácida, sem formação de gás e álcool em quantidades significativas.

Leites fermentados (Bio e Biovita) foram amostrados de prateleiras comerciais no período de 12/04/91 a 01/10/92, totalizando 36 amostras, escolhidas aleatoriamente, com a finalidade de se isolar e quantificar *L. acidophilus*. Análises físico-químicas como pH e acidez titulável em grau Dornic foram feitas, bem como as contagens do número de células totais e das resistentes aos sais biliares. Os produtos recém-fabricados foram igualmente analisados e armazenados a 5°C até o final do período de validade para serem utilizados como controle, isto porque a armazenagem no comércio pode estar ocorrendo em condições inadequadas à manutenção dos inóculos.

Inicialmente, para efeito de caracterização foram isolados de dois produtos comerciais, "Bio" e "Biovita", 4 cepas (2 de cada) de lactobacilos Gram positivos, catalase negativos e que não fermentam os carboidratos sorbitol e manitol. Para a caracterização das colônias e verificação do comportamento dos lactobacilos nos meios MRS e LAPTg, foram isoladas e enumeradas num total de 36 amostras durante 18 meses. O aspecto distintivo fundamental foi sempre o de crescimento em meio contendo sais biliares.

A contagem total foi feita através do método em placa com Agar MRS (BRENNAN et alii, 1983; GILLILAND & SPECK, 1977b) e Agar LAPTg (CERELA, 1991) a pH 6.5, e pelo método de microscopia direta em lâmina (DMC) corada com Azul

de Metileno (RICHARDSON , 1985). Esse metodo foi feito com a finalidade de comparação com uma possível contagem de células dos produtos, coradas com Acridine Orange, que diferencia células vivas e mortas (PETTIPHER et alii, 1980). Para o isolamento e contagem seletiva de *L. acidophilus* foram utilizados os meios anteriores, adicionados de 0,15% de sais biliares (oxgall) seguindo as devidas diluições em água peptonada 0,1% .

3.2.2.AVALIAÇÃO DA RESISTENCIA AOS SAIS BILIARES

As culturas CH2 e NCFM"L" foram utilizadas como controle para comparar a resistência aos sais biliares das cepas isoladas dos produtos comerciais. As curvas de crescimento foram feitas em caldo MRS e MRS adicionado de 0,3% e 0,6% de sais biliares. Erlenmeyers contendo 50 ml de meio estéril foram inoculados com 1% de culturas crescidas a 37°C por 24 horas. Os meios assim inoculados foram incubados em banho-maria a 37°C por 8 horas e o crescimento monitorado através do Espectrofotômetro Digital (MICRONAL modelo B 34211). A leitura foi feita em Absorbância em comprimento de onda de 600nm. A densidade óptica inicial foi determinada através do caldo MRS isento de sais biliares e considerada zero, sendo que as densidades ópticas iniciais dos caldos contendo 0,3% e 0,6% foram, respectivamente, 0,01 e 0,05 (GILLILAND , et alii , 1984).A análise de significância entre os tratamentos utilizados foi feita através das médias de três repetições obtidas pelo Método Tukey (GOMES , 1982).

3.2.3.OBSERVAÇÃO AO MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

As amostras dos produtos comerciais foram inicialmente filtradas em papel de filtro (WHATMAN nº 1) para que a caseína do leite não interferisse na visualização pelo fato de apresentarem também fluorescência . A seguir,

foram diluídas em água peptonada 0,1%, centrifugadas a 3000 rpm por 1 minuto e novamente filtradas. As culturas puras também foram preparadas para a visualização após serem cultivadas a 37°C por 18 horas nos caldos MRS e MRS adicionado de 0,15%, 0,30% e 1,0% de sais biliares com a finalidade de comparar as curvas de crescimento e deste modo apontar as cepas de melhor resistência aos sais biliares.

Para filtrar e reter os microrganismos foi utilizada a membrana de policarbonato ("Nuclepore"), de porosidade 0,20 µm de diâmetro, pré-tratada com pigmento "negro ácido" ou Irgalan Black 107 (Ciba Geigy) a 0,2% em ácido acético comercial por 48 horas. Esse tratamento como já indicado anteriormente, é essencial para reduzir fluorescência indesejada da membrana (HILL, 1991; HOBBIÉ, et alii, 1977; PETTIPHER et alii, 1980). Após centrifugação, 0,2 ml de solução aquosa de Acridine Orange à 0,1% foi adicionado a cada ml de amostra permanecendo incubada por 1 minuto a 30°C. Prosseguindo-se, as amostras foram filtradas através de seringa descartável acoplada ao suporte de filtro Millipore o qual continha a membrana de policarbonato apoiada sobre outra membrana, esta sendo um filtro Millipore comum. Depois de secas ao ar as membranas de policarbonato contendo as bactérias retidas na filtração foram colocadas entre lâmina e lamínula e óleo de imersão para observação com objetiva de 100x ao Microscópio de Epifluorescência (JENALUMAR da ZEISS Oriental).

Outros fluorocromos foram também testados como Calcoflúor, Acriflavina, Primulina e Vermelho do Congo (MUNCK, 1989). Para Calcoflúor o filtro de excitação usado foi o UV à 410 nm de comprimento de onda e o filtro de barreira usado tinha 244 nm de comprimento de onda; já as amostras coradas com AO foram observadas com filtro excitação Azul, à 510 nm e de barreira à 247 nm de comprimentos de onda respectivamente.

3.2.4.OBSERVAÇÃO AO MICROSCOPIO ELETRONICO DE VARREDURA (MEV).

Como já exposto no item 3.1.4 deste trabalho as amostras preparadas anteriormente para Microscopia de Fluorescência foram, após filtração em membrana de polycarbonato, lavadas em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7.2) por 1 minuto. Em seguida foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M contendo Ruthenium Red (RR) 500 ppm durante 2 horas a 4°C, seguido de lavagem em tampão cacodilato 3 vezes por 10 minutos (LEWIS, et alii , 1987; HANDLEY , et alii , 1988; OVERDAHL & ZOTTOLA, 1991). O processo de desidratação alcoólica foi feito a temperatura ambiente , em concentrações crescentes de solução água-álcool por 5 minutos cada; álcool:butanol por 10 minutos; e butanol puro até o momento da desidratação no aparelho de secagem em ponto crítico, na seguinte ordem :

- .solução água-álcool : 30 %
- 50 %
- 70 %
- 90 %
- 100 % (2 vezes)
- .solução álcool:butanol 1:1 (2 vezes)
- .butanol puro

3.2.5.ESTUDO ESTRUTURAL AO MICROSCOPIO ELETRONICO DE TRANSMISSAO (MET).

A camada externa da parede celular de *L. acidophilus* foi observada através de técnicas de inclusão em Epon e coloração negativa com ácido fosfotúngstico (PTA).

Para a técnica de inclusão em Epon foi amostrada apenas a cultura CH2 cultivada em caldo MRS a 37°C. Após centrifugação, o sedimento constituído pelos lactobacilos foi fixado com solução de Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 1 e 1/2 hora , seguido de

lavagem com tampão cacodilato 0,1 M e fixação com solução de OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) por 3 horas em ambiente escuro. Após outra lavagem com o mesmo tampão por 5 minutos, a amostra foi tratada com solução de Acetato de Uranila 1% em etanol 30% durante 30 minutos, seguido de desidratação nas soluções de água-etanol por 10 minutos cada; etanol absoluto 10 minutos e óxido de propileno 20 minutos da seguinte forma :

- .solução água-etanol : 30%
- 50%
- 75%
- 95%
- .etanol absoluto (3 vezes)
- .óxido de propileno

A amostra desidratada permaneceu infiltrada na mistura óxido de propileno e resina de Epon/Araldite a 1:1 por uma noite; a seguir foi incubada a 37°C por 1 hora em resina. Os moldes contendo as amostras incluídas em resina foram incubados a 60°C durante 3 dias.

A técnica de coloração negativa consistiu no envolvimento da bactéria por um meio elétron-denso, de modo que a imagem se apresentasse negativa, isto é, as bactérias permaneciam claras, mais transparentes do que o fundo da preparação. Os meios elétron-densos ou contrastantes são soluções de metais pesados e com granulação fina. Para a técnica de coloração negativa, as culturas suspensas nos caldos MRS e MRS adicionado de 1,0% de sais biliares e lavadas em água peptonada 0,1% foram fixadas com PTA 1,0% por até 10 minutos (ARAUJO et alii , 1986; HERALD & ZOTTOLA, 1988). Depois de secas ao ar foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão(ZEISS EM 9 S2).

3.2.6. TESTE DE COLONIZAÇÃO EM RATOS SPF

Um número de 8 ratos Wistar machos com peso

inicial em torno de 150g e 50 dias de idade foram alimentados com os produtos Bio e Biovita misturados as rações Nuvilab CR₁ e Caseína à 18% (AIN 76).

Metade dos ratos recebeu durante 5 dias a dieta de Nuvilab ou AIN 76 enriquecidas com Bio ou Biovita na razão de 3:1, a seguir 2:1 e no quarto dia equilibrados em 1:1. Os quatro ratos restantes receberam, dois a dois Nuvilab ou AIN 76 apenas e foram considerados como controles.

No 5^o dia de ensaio os animais foram novamente pesados, anestesiados e sacrificados. Os intestinos delgados foram retirados, abertos, suavemente lavados em salina e fixados em solução fixadora e preparados segundo a mesma rotina empregada para o MEV (HOOD & ZOTTOLA , 1987).

4.RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1.ISOLAMENTO E ENUMERAÇÃO

4.1.1.ISOLAMENTO

Com respeito aos isolamentos apresentados em 3.2.1., dos produtos comerciais Bio e Biovita obtiveram-se colônias características de *L. acidophilus*.

Os isolamentos feitos em Agar MRS adicionado de 0,15% de sais biliares apresentaram colônias filamentosas, rugosas, de cor branca e diâmetro aproximado de 0,1 cm confirmados anteriormente por BUCHANAN & GIBBONS (1974), GILLILAND & SPECK (1977d) e JOHNSON et alii (1980). Neste trabalho, nos crescimentos em superfície não ocorreram os dimorfismos apresentados por KLAENHAMMER (1982), pois as colônias eram sempre rugosas.

As culturas puras foram codificadas com as iniciais BI e BV identificando os isolados dos produtos Bio e Biovita respectivamente, armazenadas a 5^oC em tubos com

meio MRS agarizado e reativadas mensalmente.

4.1.2. pH , ACIDEZ TITULAVEL E CONSERVAÇÃO

As 36 amostras analisadas desde o dia de distribuição no comércio até o 25º dia apresentaram valores de pH e acidez titulável considerados dentro dos padrões normais para leites fermentados em geral (RICHARDSON , 1985; ROGINSKI , 1988). Além disso, os valores obtidos de pH e acidez Dornic permaneceram entre 4,0 e 5,0 e 75 a 100º Dornic. Dessa forma podem ser considerados adequados para a manutenção de *L. acidophilus* em leite e produtos lácteos.

4.1.3. ENUMERAÇÃO

De acordo com a classificação dos probióticos, os produtos devem conter células viáveis, em quantidades mínimas de 10^8 a 10^9 ufc por ml ou grama de produto (DALY, 1991; FULLER , 1986; GILLILAND , 1979).

Dos dois meios utilizados para as contagens total e seletiva, o meio LAPTg agarizado formulado em laboratório demonstrou crescimento eficiente das colônias , assim como ocorreu no meio MRS agarizado . No entanto, as contagens foram feitas no meio MRS agarizado porque este último demonstrou maior crescimento dos lactobacilos . As contagens revelaram que o produto Bio continha lactobacilos resistentes a 0,15% de sais biliares demonstrando 10^8 células por grama de produto (Tabela 1). Para o produto Biovita o número de bactérias após a adição de 0,15% de sais biliares no meio foi da ordem de 10^7 células por grama de produto. As diluições contadas em placa foram de 10^{-5} e 10^{-6} para as amostras.

Das amostras comerciais de Bio e Biovita cujo período de vida útil declarado é no máximo trinta dias, os resultados de cultivos em placa demonstraram que o número de lactobacilos viáveis em ambos não diminuiu ao final do período. De fato, os valores de pH ao final da vida útil permaneciam muito próximos de 4,0 , portanto adequado para lactobacilos pois HOOD & ZOTTOLA (1988) demonstraram a resistência destes microrganismos frente a pH 2,0 , 3,0 e 4,0.

TABELA 1. Contagem Total (CT) em placa (ufc/g de produto) em Agar MRS a 37°C ; Contagem seletiva (CS) de lactobacilos em MRS (+ 0,15%) de sais biliares e Contagem Total em Lâmina (CL) (células/ml) dos produtos Bio e Biovita amostrados de prateleiras comerciais e dos recém-fabricados e armazenados a 5°C por 25 dias. Valores médios obtidos de 24 amostras (12 de cada) dos produtos comerciais e 12 amostras (6 de cada) dos produtos recém-fabricados.

Produtos	CT (MRS)	CS (MRS+0,15%sb)	CL (direta)
comerciais			
(idades variadas)			
Bio	2,5 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁸
Biovita	2,6 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁷	4,3 x 10 ⁸
recém-fabricados			
Bio			
dias 5°	3,5 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸	9,0 x 10 ⁸
15°	3,1 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	8,4 x 10 ⁸
25°	2,7 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	6,3 x 10 ⁸
Biovita			
dias 5°	2,0 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
15°	1,7 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁷	9,1 x 10 ⁷
25°	1,6 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁷	7,3 x 10 ⁷

Comparando-se os dados obtidos em lâmina (contados 5 campos), com os obtidos na contagem total em placa nota-se que a contagem direta em lâmina quantifica células vivas e mortas porque os valores foram mais elevados.

4.2.RESISTENCIA AOS SAIS BILIARES

A capacidade de crescimento em meios contendo sais biliares é uma das características de cepas de *L. acidophilus* (GILLILAND & SPECK , 1977a; GILLILAND et alii, 1984). O grau de resistência a bile é de grande importância, visto que o habitat dos lactobacilos inicia-se no jejuno onde a concentração de bile é maior (SKINNER , & CARR , 1974).

A figura 1 demonstra as características de crescimento da cepa CH2 mantida a 37°C em caldo MRS sem e com 0,3% e 0,6% de sais biliares. A cepa CH2 foi utilizada no trabalho devido a provável* utilização da mesma na elaboração dos produtos comerciais Bio e Biovita. O crescimento de CH2 em meio sem sais biliares foi elevado, apresentando 0,8 de Absorbância até 8 horas de incubação (fig. 1) e demonstrou redução do crescimento em meios com 0,3% e 0,6% de sais biliares. A diferença de crescimento entre os tratamentos não foi entretanto significativa ($P < 0.05$).

A cepa BI apresentou o maior crescimento em meio sem sais biliares (fig. 2), ocorrendo porém o maior grau de inibição em ambos os meios adicionados de sais biliares.

A cepa BV (fig. 3) manteve seu crescimento nos mesmos níveis para os três meios, o que indicou que a cepa isolada do produto Biovita foi mais resistente a ação dos sais biliares do que as outras cepas trabalhadas. Comparativamente, a cepa NCFM"L"

* Informação verbal da firma distribuidora de *L. acidophilus*, HA-LA do Brasil.

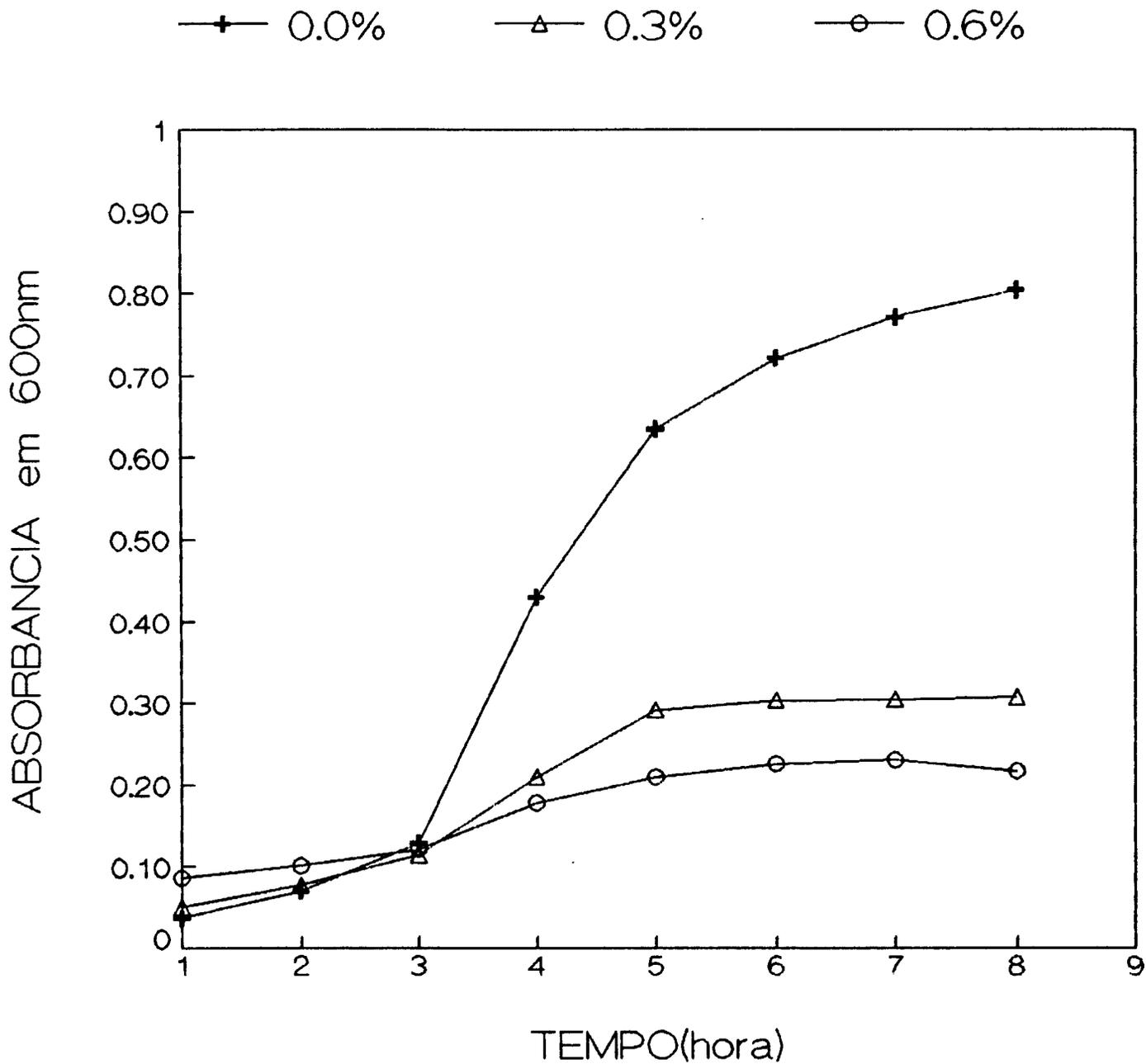


FIGURA 1: Crescimento de *L. acidophilus* CH2 em caldo MRS a 37°C em diferentes concentrações de sais biliares.

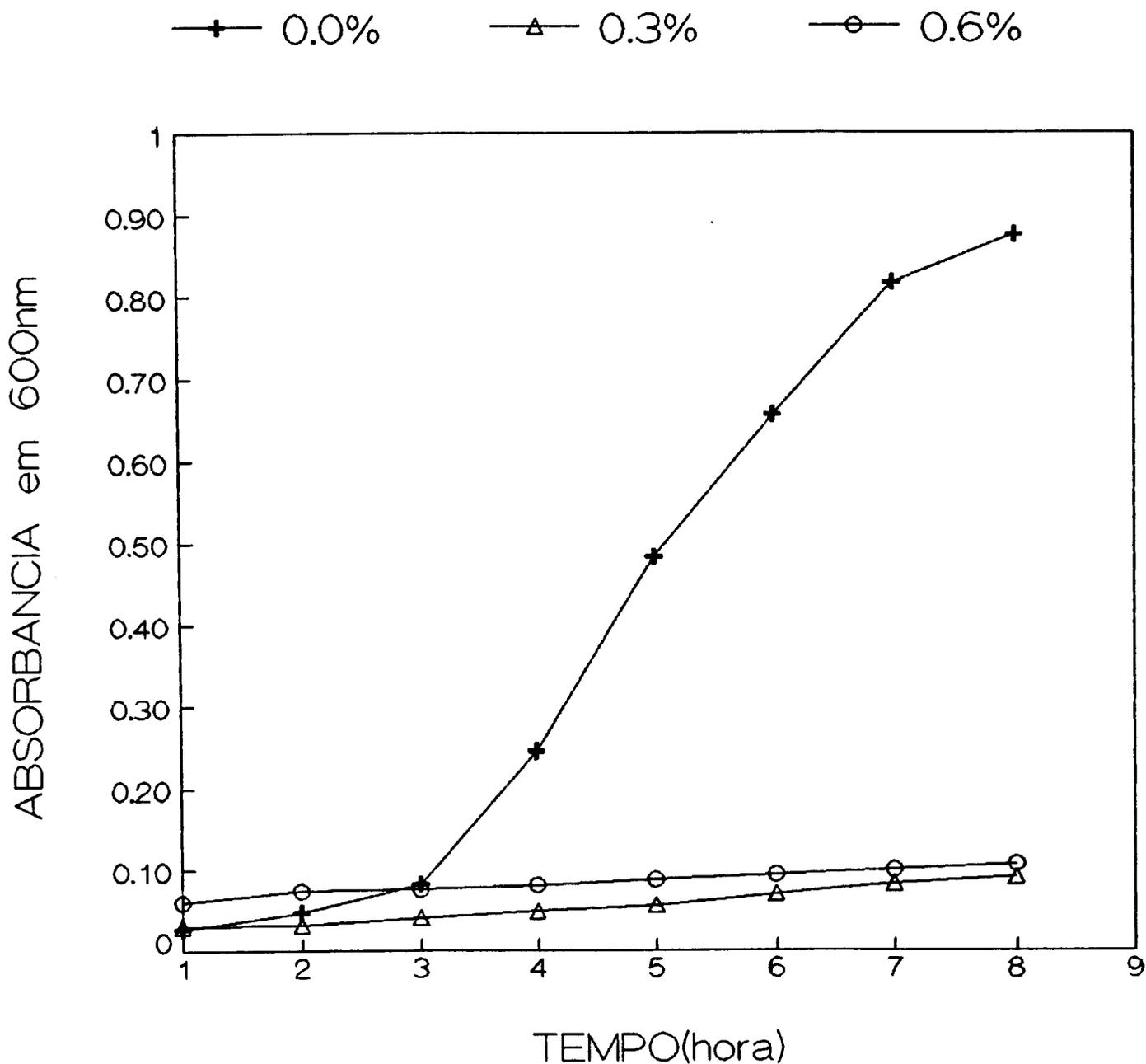


FIGURA 2: Crescimento de *L. acidophilus* BI isolado do produto Bio em caldo MRS a 37°C em diferentes concentrações de sais biliares.

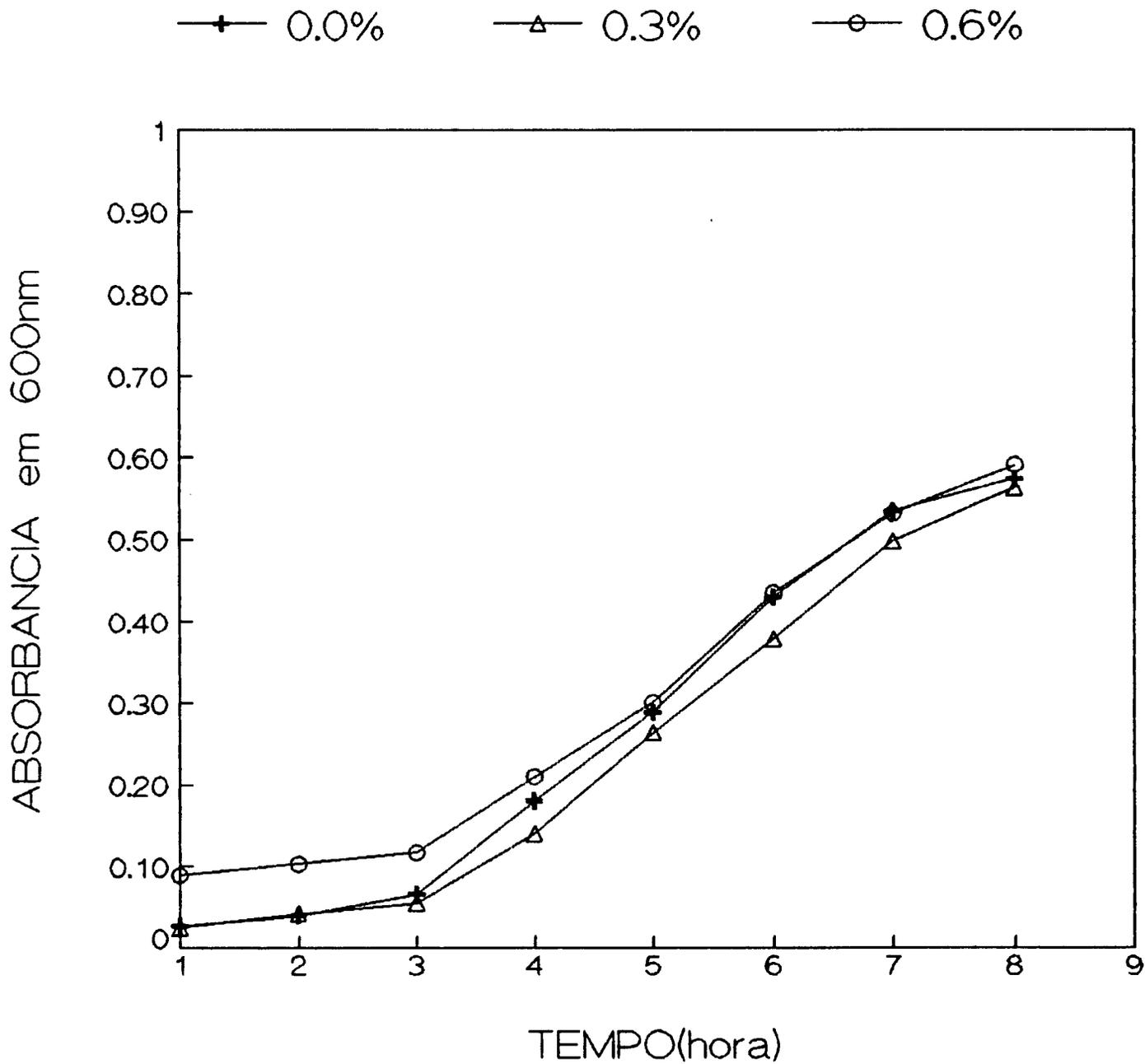


FIGURA 3: Crescimento de *L. acidophilus* BV isolado do produto Biovita em caldo MRS a 37°C em diferentes concentrações de sais biliares.

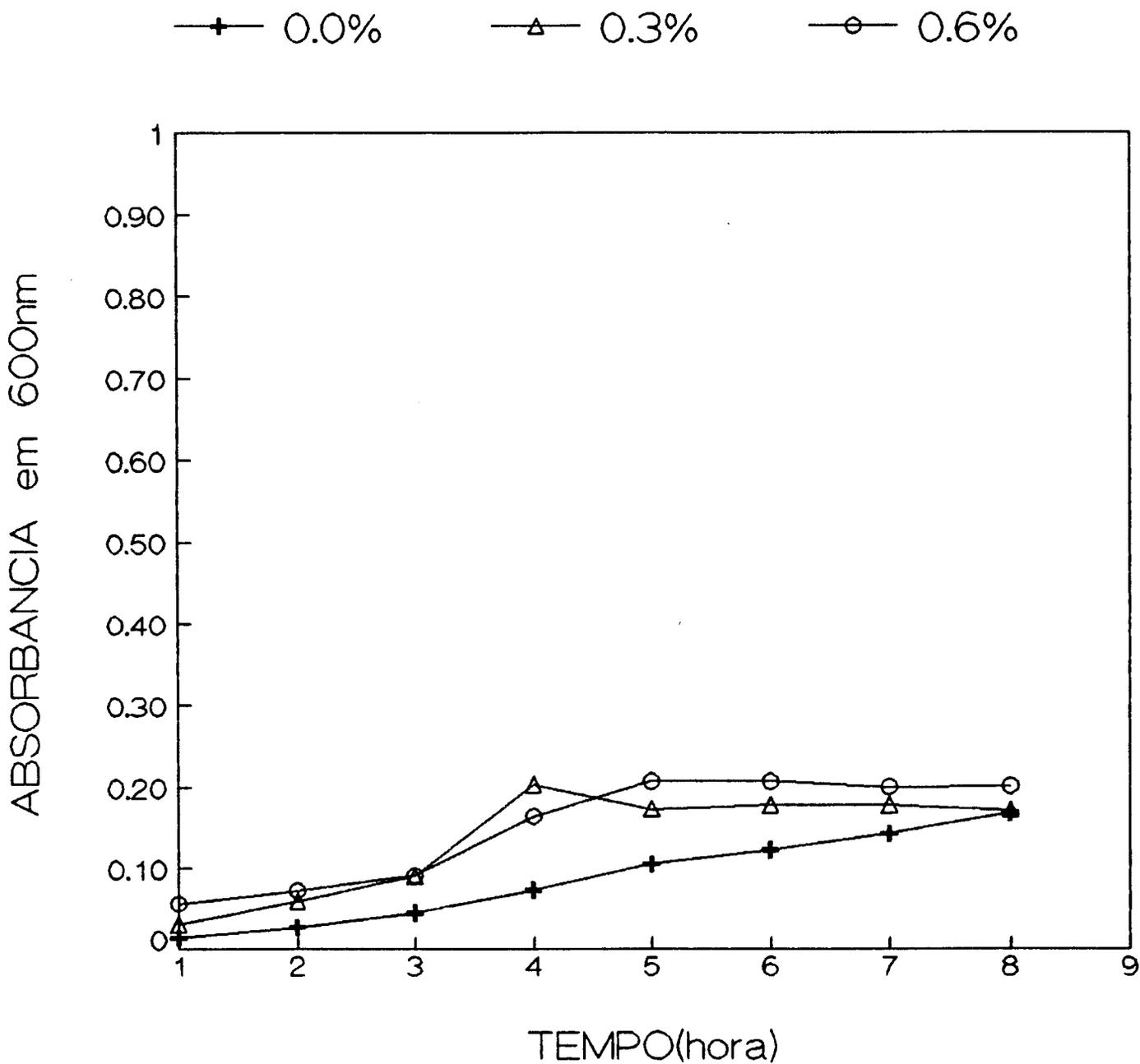


FIGURA 4: Crescimento de *L. acidophilus* NCFM "L" em caldo MRS a 37°C em diferentes concentrações de sais biliares.

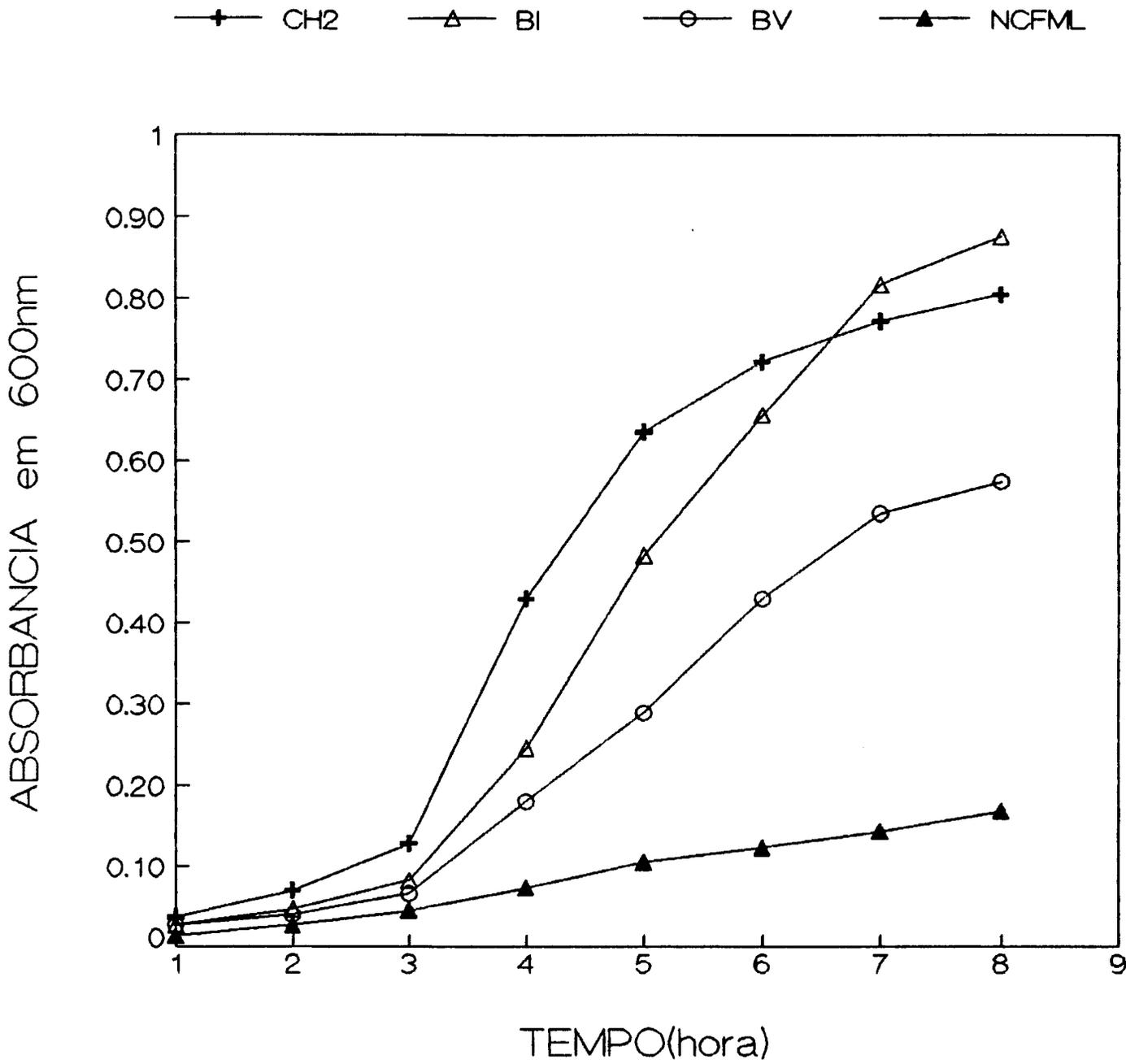


FIGURA 5: Crescimento das cepas CH2, BI, BV e NCFM"L" em caldo MRS a 37°C sem sais biliares.

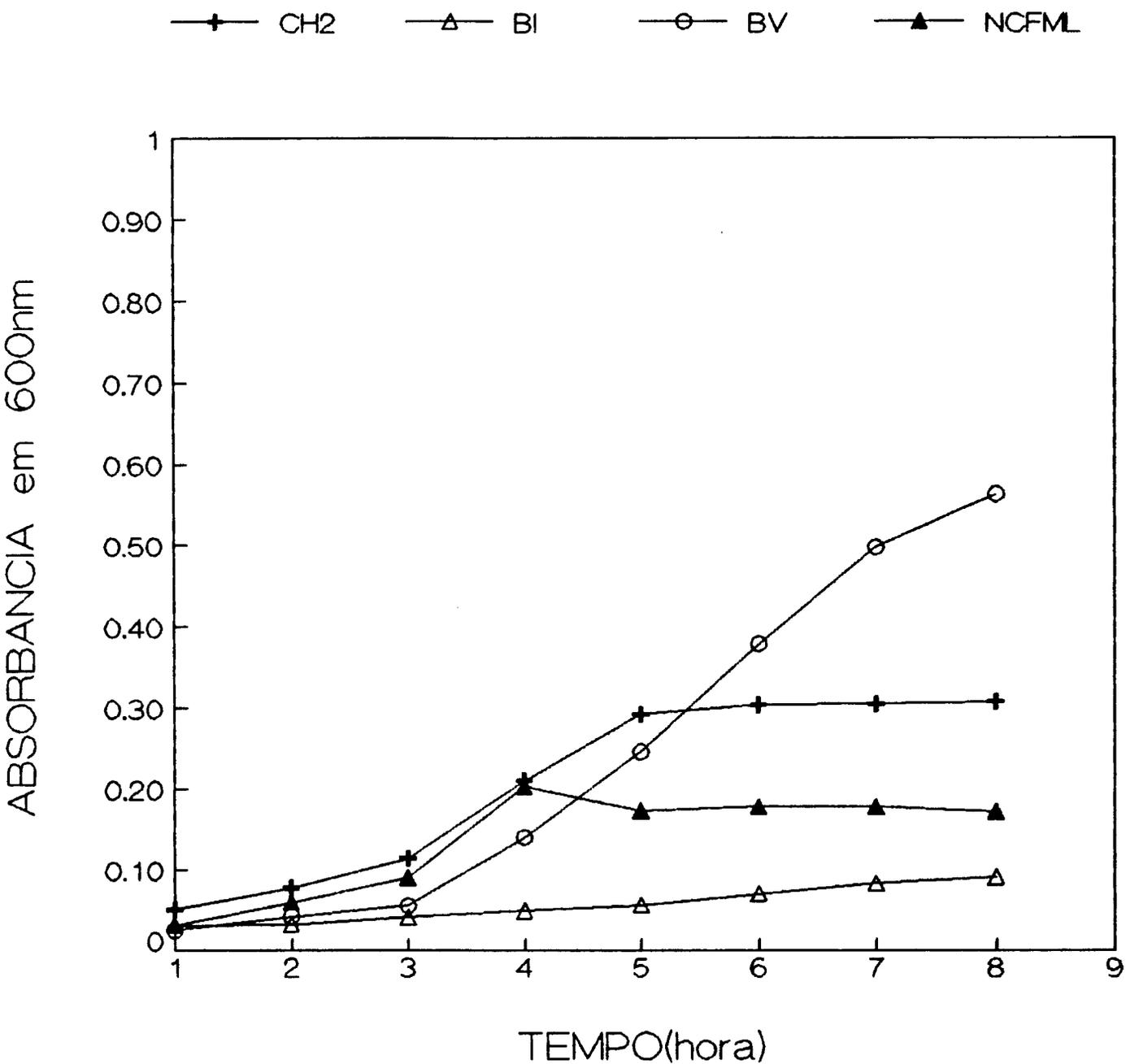


FIGURA 6: Crescimento das cepas CH2, BI, BV e NCFM'L em caldo MRS a 37°C com 0,3% de sais biliares.

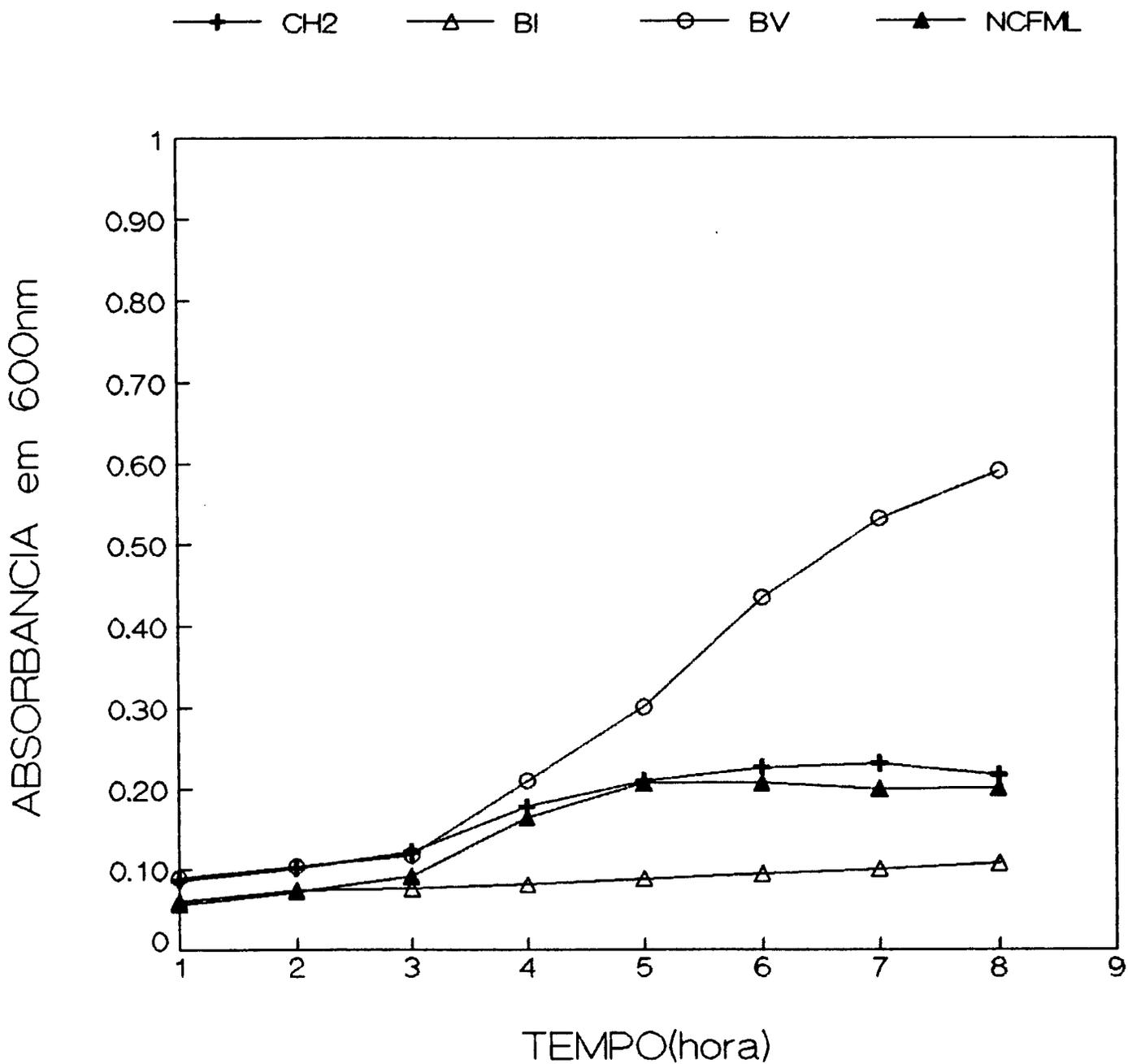


FIGURA 7: Crescimento das cepas CH2, BI, BV e NCFM“L” em caldo MRS a 37°C com 0,6% de sais biliares.

que também é resistente aos sais biliares não sofreu inibição com os tratamentos acima citados (fig. 4).

As figuras 5, 6 e 7 reúnem os dados comparativos das quatro cepas em meios sem e com 0,3% e 0,6% de sais biliares. O objetivo é demonstrar as características de crescimento entre as 4 cepas. A fig. 5 evidencia que em meio isento de sais biliares o crescimento de BI e CH2 é elevado e não diferem entre si ($P < 0,05$). O crescimento de BV é significativamente mais elevado que o de NCFM"L" ($P < 0,05$). Este resultado era esperado porque NCFM"L" apresenta crescimento mais lento em relação a muitas cepas de *L. acidophilus* (FERREIRA & GILLILAND, 1988) o que ocorreu também neste trabalho.

Os tratamentos com 0,3% e 0,6% de sais biliares trouxeram resultados análogos, demonstrando portanto que 0,3% é suficiente para caracterizar a susceptibilidade das cepas aos sais biliares. A cepa BV apresentou evidente resistência aos sais biliares assim como a cepa NCFM"L". Nestes ensaios a cepa BI demonstrou ser a mais sensível às variações de concentração dos sais biliares.

4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

4.3.1. AS PREPARAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Um dos objetivos deste trabalho com fluorescência foi padronizar uma técnica de separação dos lactobacilos do produto e contagem dos mesmos através de filtração por membrana não permeável aos lactobacilos.

A filtração das amostras embora procedida com sucesso, sobretudo após colocar um filtro Millipore no suporte do filtro, apresentou distribuição irregular das células embora se empregasse pressão e velocidade baixas de

filtragem. A membrana porosa de policarbonato empregada, mesmo escurecida pelo pigmento de "Irgalan Black", tem superfície pouco aderente e os lactobacilos nela depositados durante a filtragem tenderam a apresentar-se em grumos, sobretudo quando se tornavam filamentosos após o tratamento com sais biliares. Por esta razão o objetivo de montar um sistema de contagem não foi obtido com este método devido a distribuição desigual sobre a superfície do filtro. É evidente que a apreciação global das culturas foi perfeitamente factível porque o volume filtrado era conhecido e constante, mas as curvas de crescimento obtidas pelo estudo de crescimento em sais biliares e expressas nas figuras de 1 a 7 são mais elucidativas e tem significado numérico. Portanto pode-se recomendar o método como instrumental analítico, sem contudo apresentá-lo como método de quantificação.

4.3.2.MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Pela orientação de MUNCK (1989) empregamos vários fluorocromos recomendados para microrganismos. A fluorescência obtida com os fluorocromos , Acriflavina, Primulina, Vermelho do Congo e Calcoflúor embora positiva, não foi diferenciadora quanto ao estado fisiológico das células, não se retornando a empregá-los no trabalho. Deve-se realçar entretanto que foi o Calcoflúor que forneceu as imagens mais contrastadas (foto 1). Com Calcoflúor, o comprimento de onda empregado para excitação (UV) definiu a imagem com contraste adequado. Para os fluorocromos restantes, os comprimentos de onda foram acima dos do UV e por isso os contrastes das células contra o fundo foram sempre menores.

A coloração bicrômica obtida com Acridine Orange (AO) torna este fluorocromo muito interessante, mas a questão não pode ser simplificada entre células laranjas e vivas e células verdes e mortas. As interações do AO com os ácidos nucleicos poderiam ser específicas. Este fluorocromo é uma base hidrofóbica fraca a qual se liga a grupos fosfatos negativos, por isso é provável que a AO se ligue aos grupos fosfatos adjacentes nos ácidos nucleicos de cadeia simples, p.ex., os RNAs, e, fluoresça alaranjado devido às interações corante com corante estabelecidas em cada ponto fosfatado da cadeia. Entretanto as moléculas de AO poderão penetrar na dupla hélice do DNA e fluorescer em verde. Como a quantidade relativa de DNA é pouco variável, toda vez que a célula estiver inativa, ou morta, terá pouco RNA, predominando então a cor verde do DNA (BACK & KROLL, 1991). Para JONES (1974 in BACK & KROLL, 1991) entretanto não há uma evidência direta de que a cor de fluorescência se relacione com a atividade celular, mas do ponto de vista de JONES (1974, loc. cit.) a cor na qual a célula fluoresce é antes uma consequência da concentração e do tempo de exposição ao corante do que uma expressão da atividade celular.

No trabalho de BACK & KROLL (1991) ficou reafirmada a ligação crescimento, ou "atividade celular" com RNAs e coloração alaranjada, mas dentre as bactérias estudadas por eles, apenas estreptococos lácticos teriam certa proximidade com lactobacilos acidófilos, e exatamente para estes estreptococos, a fase estacionária de crescimento fluoresce toda em verde, mas se repicados em placa apresentam bom crescimento. No presente trabalho foi possível fotografar em fluorescência amostras coradas por AO e determinar a presença da coloração alaranjada e da coloração verde (fotos 2 e 3). A seguir, lavadas, fixadas, desidratadas e metalizadas, as amostras foram analisadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) demonstrando-se a presença de células vivas e de células mortas no produto

comercial (fotos 10 a 13). O produto Biovita quando filtrado após lavagem com água peptonada à 0,1% sobre a membrana de policarbonato, apresentou também grande quantidade de organismos com coloração laranja e verde (foto 4).

Independente do tipo de cultura analisado, todas aquelas que foram suspensas em caldo MRS e submetidas a presença de sais biliares (0,15%, 0,3% e 1,0%) apresentaram alongamento da célula individual e tendência a permanecerem ligadas em forma filamentosa (fotos 5, 6 e 7).

Devido a grande sensibilidade sobre o crescimento na presença de sais biliares pela cultura BI conforme se demonstra na curva de crescimento (fig. 2) foi observada a morfologia da cultura BI quando tratada com 0,15% e 0,30% e coradas com AO. Os resultados demonstraram variações morfológicas como células alongadas e coloração intermediária entre laranja e verde (foto 3). A cultura submetida a concentração de 0,15% apresentou segmentos vivos (laranja) alternados com mortos (cor esverdeada) indicando "sofrimento" da célula (foto 5). Em caldo com 0,3% de sais biliares, células sensíveis tornaram-se bastante delgadas o que demonstrou o aumento da sensibilidade aos sais biliares (foto 6).

A cultura BV, resistente aos sais biliares, quando submetida a tratamento com 1,0% de sais biliares apresentou células bastante alongadas porém com coloração laranja intensa, ou seja, as células permaneceram viáveis (foto 7).

Nesta altura de visualização ao microscópio óptico deve-se analisar o que estes aumentos, em torno de 1000 x oferecem em termos de tamanho e forma celular. Para KLAENHAMMER (1982), "formação filamentosa em bacilos Gram positivos ocorrem em resposta a deficiências nutricionais no

meio de crescimento. Crescimento filamentosos entre os lactobacilos se deve a alterações do potencial de óxido-redução, ao pH, à temperatura, à limitação nutricional de vitaminas e minerais". O presente trabalho demonstrou que amostras recém colhidas dos produtos já apresentavam alinhamento celular filamentosos mas o predomínio destas formas ocorreu nos isolados cultivados em MRS com sais biliares.

Em outra situação, isto é no cultivo em Agar, as colônias eram rugosas e quando fixadas para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as colônias se apresentaram também filamentosas (fotos 8 e 9). Neste caso o mesmo KLAENHAMMER (1982) explica : "transições morfológicas entre colônias rugosas e lisas são características dos lactobacilos e refletem uma resposta fenotípica da bactéria aos diferentes ambientes de crescimento".

Encerrando a discussão sobre a morfologia dos lactobacilos ao nível do que se apresenta em microscopia óptica de fluorescência pode-se concluir que :

1. Os produtos comerciais apresentaram bacilos curtos e também de forma alongada.
2. Os produtos comerciais apresentaram bacilos vivos e mortos onde predominaram os elementos vivos.
3. Os isolados dos produtos comerciais cresceram em presença de sais biliares e demonstraram crescente alteração morfológica dos bacilos.
4. É provável que bacilos filamentosos indiquem colônias em boas condições ambientais e os muito alongados , flexuosos e com menor diâmetro indiquem células em vias de inativação.

4.4.MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA

Os produtos comerciais amostrados apresentaram bactérias do tipo cocos e bacilos de tamanhos variados, de acordo com a fase de proliferação das células (fotos 10, 11, 12 e 13). Tanto os estreptococos como os lactobacilos dos produtos Bio e Biovita possuíam conformação e tamanhos característicos; os lactobacilos apresentaram comprimentos variáveis como se vê nas fotos 10 ou 11. O meio utilizado para crescimento dos lactobacilos interfere diretamente no tamanho das células (ROGINSKI , 1988). O cultivo em leite determina células mais curtas e formas definidas, enquanto que meios sólidos (fotos 8 e 9) produzem colônias formadas por lactobacilos alongados (SHAHANI & CHANDAN , 1979). As evaginações da parede celular, por exemplo nas fig. 12 e 13 serão discutidas no próximo parágrafo.

Conforme foi visto no item 4.2 as cepas em estudo apresentaram níveis de tolerância distintos em relação aos sais biliares. As culturas BV e NCFM"L" em caldo MRS sem sais biliares demonstraram-se morfológicamente muito semelhantes (fotos 14 e 15). Na presença de 1,0% de sais biliares demonstraram-se ainda resistentes e as formas celulares das duas culturas apresentaram-se tanto semelhantes quanto inalteradas (fotos 16 e 17), ao contrário das cepas CH2 e BI que não resistiram àquela concentração . As fotos 18 e 19 mostram as células das cepas CH2 e BI na ausência de sais e nas fotos 20 e 21 as mesmas cepas em cultivos contendo 1,0% de sais biliares: são numerosas as células mortas ao lado de células resistentes. Estes resultados caracterizam a resistência relativa aos sais biliares em conformidade ao que foi discutido por OVERDAHL & ZOTTOLA (1991) e KLAENHAMMER & KLEEMAN (1981).

4.4.1.A PAREDE CELULAR AO MEV

Cumpra agora para encerrar a discussão de morfologia ao nível de MEV, analisar os brotamentos da parede celular das bactérias, as quais podem ser vistas nas fotos de 10 a 21.

São prolongamentos ou brotamentos da parede que visivelmente túrgidos, devem conter parcela do citoplasma da bactéria. Ocorreram em nossas culturas indistintamente, quer fosse nas cepas filtradas a partir dos produtos comerciais (fotos 10 e 11), quer estivessem em caldo MRS sob o stress da presença de sais biliares (fotos 20 e 21). Este fato já foi amplamente divulgado na literatura, e ainda mais, não são restritos aos *L. acidophilus* : ocorrem por exemplo entre as *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus sp* (HIGGINS et alii, 1973; FRASER & GILMOUR , 1986; LEWIS et alii , 1987) e *L. acidophilus* isolados de aves (BROOKER & FULLER , 1975). Neste caso, BROOKER & FULLER (1975) descrevem os brotamentos dos *L. acidophilus* como conexões emitidas das células para a superfície de adesão (epitélio da moela de frango) e como conexões entre as bactérias. Neste trabalho, na foto 10 e foto 13 demonstra-se claramente as conexões entre as células as quais não se restringem aos lactobacilos : os estreptococos presentes também se apresentaram ligados por brotamentos.

HIGGINS et alii (1973) observando a parede celular de *L. acidophilus* (cepa 63 AM Gasser) em preparações por criofratura mostrou uma parede celular homogênea, e de superfície lisa. No mesmo trabalho a membrana celular das bactérias, quando fotografada ao MET, é caracteristicamente trilaminar como o é para a maioria dos organismos Gram positivos. A seguir estes autores demonstraram que as

culturas em fase de autólise apresentavam extrusões da membrana celular nos mesmos locais onde, na fase de crescimento exponencial demonstraram invaginações da parede, ou seja nos polos celulares, na posição subpolar e na região septal. Geralmente quando ocorria um brotamento, a ele se seguiam vários outros de pequeno tamanho. Este processo marcava o início de dissolução da parede celular e a consequente autólise. HIGGINS et alii (1973) entretanto concluem que a autólise pode se iniciar da maneira descrita mas o crescimento também poderia estar ocorrendo através do brotamento que estaria se formando em uma zona "mais fraca" da membrana celular. No presente trabalho ficou evidente que em meio MRS acrescido de sais biliares em níveis a partir de 0,3% de concentração, se alterava a capacidade de segmentação dos lactobacilos os quais permaneciam interligados pelos polos formando um longo eixo sincicial (fotos 6 e 7) de bactérias. É necessário que se discuta agora a morfologia obtida no estudo ao MET. Neste caso, quer por inclusão ou por contraste negativo a preservação da camada externa da bactéria é otimizada e então ao problema dos brotamentos da parede celular se acrescenta a existência das fímbrias de carboidratos remetendo a questão para o significado destas fímbrias e a sua relação com a adesividade das células ao meio de suporte, ou no caso dos probióticos, à capacidade de povoar o jejuno e o íleo humano.

4.5. MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As duas técnicas de preparação empregadas para o estudo ao MET eram distintas. A técnica de inclusão em Epon, cortes ultrafinos e contraste com acetato de uranila permitiu a observação do citoplasma e das áreas eletrodensas

da parede celular (fotos 22 e 23). A técnica de coloração negativa obtida com as bactérias vividas colocadas sobre a tela de observação e contrastadas com PTA à 1% permitiu dimensionar a extensão das fímbrias das bactérias suspensas em MRS à 0,3% de sais biliares (foto 24) e a ausência destas fímbrias quando submetidas à 1% de sais biliares (fotos 25 e 26).

As fotos 22 e 23, distintamente das ilustrações ao MEV, apresentam agora os lactobacilos em secções finas que evidenciam a estrutura da parede. Na região onde o corte da secção passa tangencial à superfície bacteriana a camada externa está mais característica (22). Como se espera a retração desta camada no momento da fixação, uma visão destas células após cultivo em caldo MRS com 0,3% de sais biliares apenas contrastadas com o PTA seria esclarecedora quanto ao alongamento real da fímbria. Efetivamente a foto 24 demonstra o revestimento aveludado em toda a sua extensão e sua regularidade.

Nas fotos subsequentes (25 e 26) se demonstrará a ausência do revestimento, fato ocorrido nas células que receberam sais biliares em concentração de 1%. A dificuldade de separação entre as células aparece aí bem configurada em 25 e 26 ; este fato foi abordado anteriormente quando se discutiu a morfologia das células no estudo com sais biliares em MEV.

A presença e a permanência da camada externa aveludada é de capital importância. BROOKER & FULLER em 1975 demonstraram que a camada externa dos lactobacilos tem extensos componentes polissacarídicos ácidos que se demonstram com Rutênio Vermelho ou Azul de Alcian ou Ouro Coloidal. Posteriormente a presença de polissacárides foi associada a todos os fenômenos de adesão bacteriana. Hoje (SHARON & LIS , 1993), já se reconhece que adesão bacteriana

é na verdade a expressão do fenômeno do reconhecimento celular e muitas proteínas que operam o reconhecimento na superfície das células foram descobertas e se acumulam evidências, que em muitos casos, são os carboidratos ancorados nas proteínas que se identificam como os marcadores primários do reconhecimento celular.

Assim com referência aos itens 4.4 à 4.5 pode-se concluir nestes estudos de microscopias eletrônicas que :

1. Nos produtos comerciais em condições adequadas, a presença de estreptococos nos probióticos não alterava a estrutura celular assim como já visto neste trabalho não haviam competido com o crescimento dos lactobacilos.

2. É fato rotineiro que os aspectos externos sobretudo dos lactobacilos são distintos à medida que se passa de uma técnica de preparação e análise para outra. Neste trabalho a nível de Microscopia Eletrônica de Varredura esclarece-se que as cepas de *L. acidophilus* sensíveis à concentrações de sais biliares à 0,3% e acima diminuem a capacidade de individualização das células. Por outro lado descreve-se a presença de brotamentos apicais ou laterais que estabelecem contatos entre os indivíduos ou destes com o meio de suporte. Neste trabalho não se associou o brotamento à autólise.

3. A Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrou que o revestimento externo dos lactobacilos, o qual responde pelas propriedades de reconhecimento e adesão bacteriana, é destruído nas cepas que não resistem às condições adversas, no caso concentrações de 0,3% de sais biliares e acima.

4.6. ENSAIO DE ALIMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS EM RATOS SPF

As dietas administradas, ração comercial formulada com ingredientes essencialmente vegetais e ração à base de caseína e carboidratos refinados, AIN 76 são empregadas rotineiramente em nosso laboratório (Laboratório de Microestrutura de Alimentos-DEPAN) e expressam boa aceitação e ganho de peso pelos animais. Neste ensaio a presença gradual da mistura de probióticos (Bio e Biovita) e rações foi aceita avidamente pelos animais não ocorrendo amolecimento das fezes mesmo quando a mistura chegou à proporção de 1:1.

O exame ao MEV dos intestinos delgados dos ratos controles, alimentados por Nuvilab CR₁ ou por AIN 76 eram normais. A partir do jejuno e no íleo apresentaram bactérias aderidas aos enterócitos através de prolongamentos muito nítidos (foto 27) as quais, embora desconhecidas não são com evidência lactobacilos.

A morfologia do intestino delgado dos ratos que receberam Bio ou Biovita foi idêntica à dos controles. A foto 28, através de uma ruptura mecânica do revestimento da vilosidade demonstra um perfil de enterócitos normais assim como está bem preservada a bordadura em escova sobre a qual poderiam aderir os lactobacilos. Não ocorreu entretanto colonização dos intestinos pelos lactobacilos, demonstrando portanto que apesar de administrá-los vivos o intestino do rato não tem especificidade para as cepas contidas nos produtos Bio e Biovita.

No item 4.4.1 deste trabalho apresentamos a morfologia externa destes lactobacilos, os quais demonstram brotamentos da parede semelhantes àqueles que demonstramos na foto 27, ou seja para outras bactérias intestinais dos ratos. Todavia os brotamentos dos lactobacilos não demonstraram especificidade com a membrana celular dos

enterócitos do rato. Este experimento demonstrou que testes de colonização ou sobrevivência dos lactobacilos de produtos probióticos de humanos provavelmente não terão resposta positiva em roedores.

Enquanto aguardávamos o final deste ensaio tomou-se conhecimento do artigo de SHARON & LIS (1993) onde se reafirma a seletividade que rege os fenômenos de adesão bacteriana, portanto o resultado a ser obtido não surpreendeu. Dado que o estudo presente está interessado na avaliação de lactobacilos humanos não haverá interesse em prosseguir neste experimento o qual passa a exigir o isolamento de *L. acidophilus* das fezes de rato para o respectivo estudo de aderência.

enterócitos do rato. Este experimento demonstrou que testes de colonização ou sobrevivência dos lactobacilos de produtos probióticos de humanos provavelmente não terão resposta positiva em roedores.

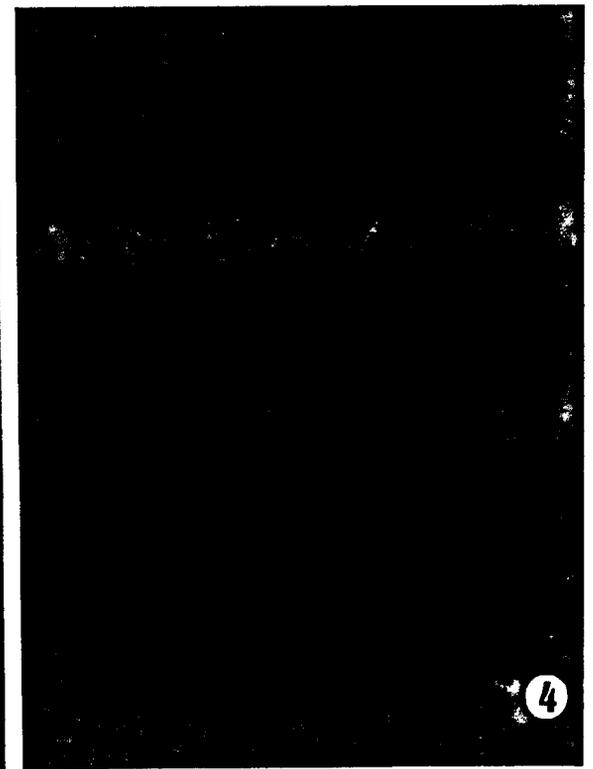
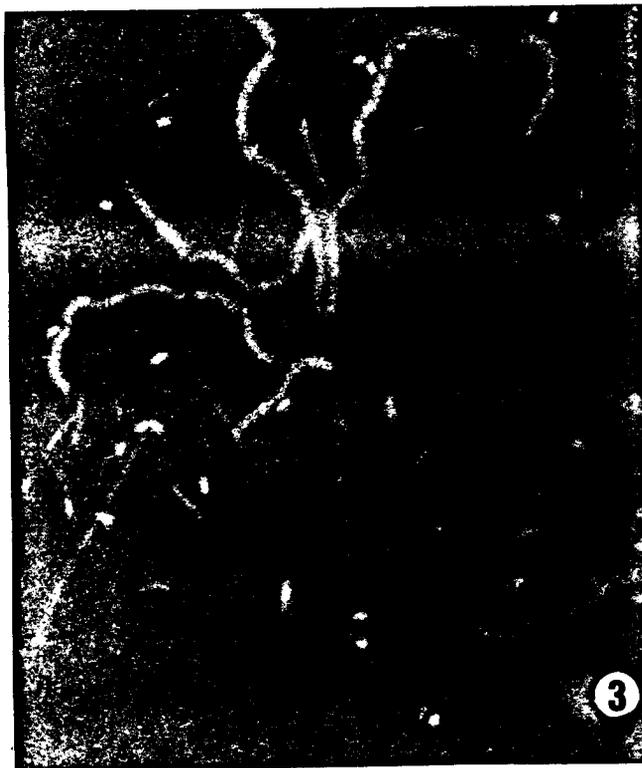
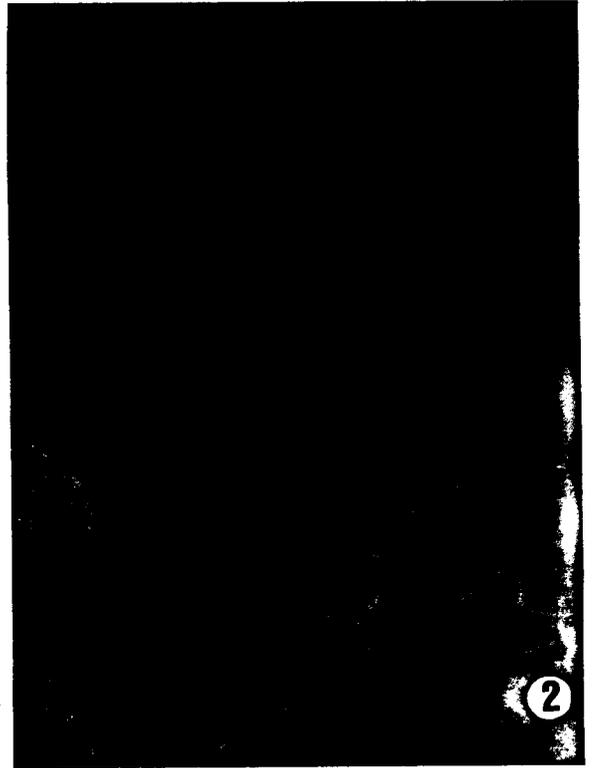
Enquanto aguardávamos o final deste ensaio tomou-se conhecimento do artigo de SHARON & LIS (1993) onde se reafirma a seletividade que rege os fenômenos de adesão bacteriana, portanto o resultado a ser obtido não surpreendeu. Dado que o estudo presente está interessado na avaliação de lactobacilos humanos não haverá interesse em prosseguir neste experimento o qual passa a exigir o isolamento de *L. acidophilus* das fezes de rato para o respectivo estudo de aderência.

FOTO 1: Lactobacilos amostrados do produto comercial Bio contrastados com Calcofluor e observados sob excitação de radiação de 244 nm e emissão média de 410 nm; (630x).

FOTO 2: Células vivas (laranja) e inativas (verde) obtidas do produto comercial Bio coradas com AO e observadas sob excitação de radiação de 247 nm e emissão média de 510 nm (630x).

FOTO 3: Células vivas (laranja) e inativas (verde) obtidas do produto comercial Bio coradas com AO (630x).

FOTO 4: Células vivas (laranja) e inativas (verde) obtidas do produto comercial Biovita coradas com AO (630x).



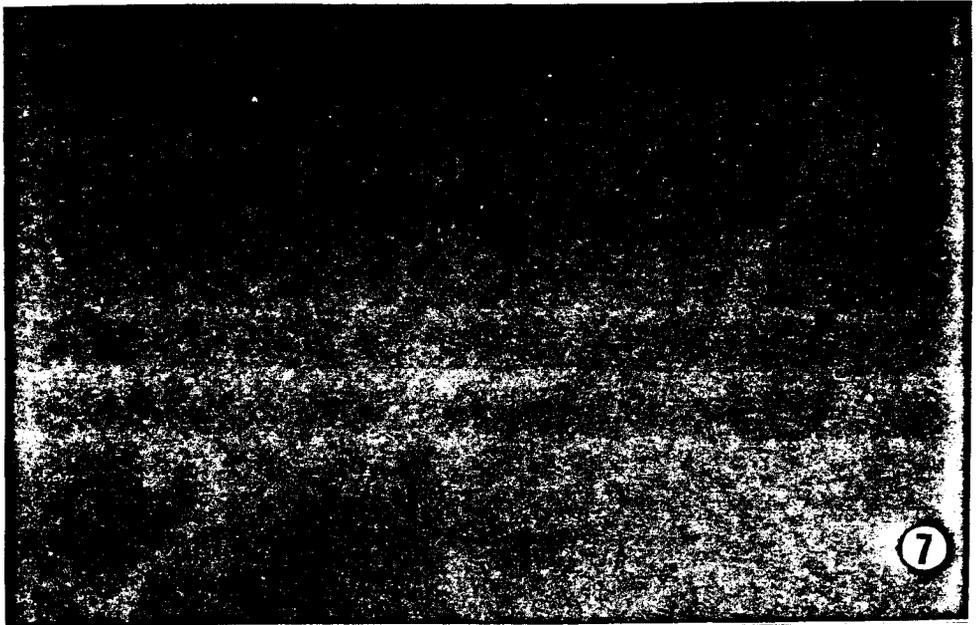
- FOTO 5: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 0,15% de sais biliares e corado com AO. Elongamento das células inativas (verdes), mas apresentando individualização das células, sobretudo nas ativas (630x).
- FOTO 6: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 0,3% de sais biliares e corado com AO. Elongamento progressivo das células inativas. A seta ↗ indica células mortas e a seta ↘ indica células ativas (630x).
- FOTO 7: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Biovita (cultura BV) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares e corado com AO. Embora a caseína remanescente esteja fluorescendo, a resistência da cultura aos sais biliares é evidenciada (630x).



5



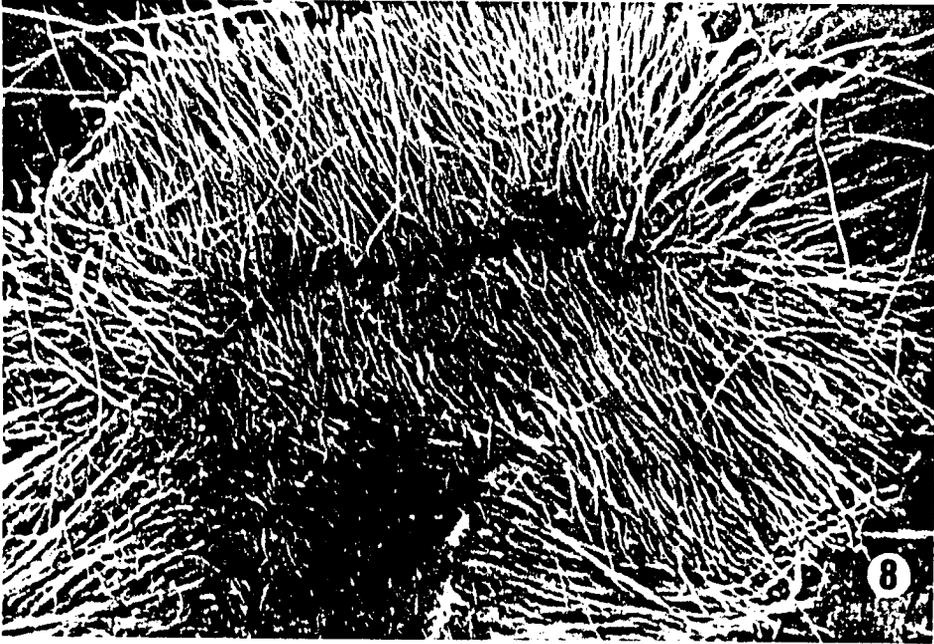
6



7

FOTO 8: Colônia de *Lactobacillus acidophilus* isolada do produto comercial Bio cultivada em meio MRS agarizado com 0,15% de sais biliares observada ao MEV a 20 KV. A micrografia apresenta a forma característica que possui a colônia em crescimento de superfície (750x).

FOTO 9: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio cultivado em meio MRS agarizado com 0,15% de sais biliares observado ao MEV a 30 KV. Ocorre a alongação decorrente da presença dos sais biliares (1500x).



- FOTO 10: Lactobacilos e estreptococos contidos no produto comercial Bio observados ao MEV a 15 KV. A formação grumosa no canto superior esquerdo é caseína (7000x).
- FOTO 11: Lactobacilos e estreptococos contidos no produto comercial Biovita observados ao MEV a 15 KV (3600x).
- FOTO 12: Produto Bio observado ao MEV a 25 KV. Brotamentos cuja origem e significado não estão esclarecidos (15000x).
- FOTO 13: Produto Biovita observado ao MEV a 25 KV. Observar que os brotamentos relacionam os estreptococos e os lactobacilos entre si (15000x).

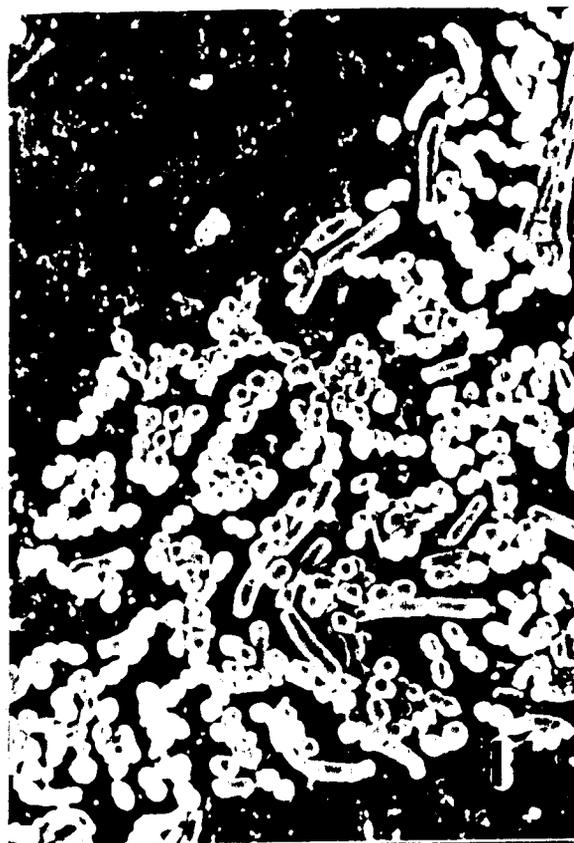


FOTO 14: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Biovita (cultura BV) cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. A aparência normal das células está relacionada ao crescimento em caldo e a ausência de sais biliares (5100x).

FOTO 15: *Lactobacillus acidophilus* NCFM"L" cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. Embora as células apresentem um turgor adequado esta cultura apresenta um início de resistência à individualização das células (5100x).

FOTO 16: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Biovita (cultura BV) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. É evidente a resistência das células aos sais biliares (5100x).

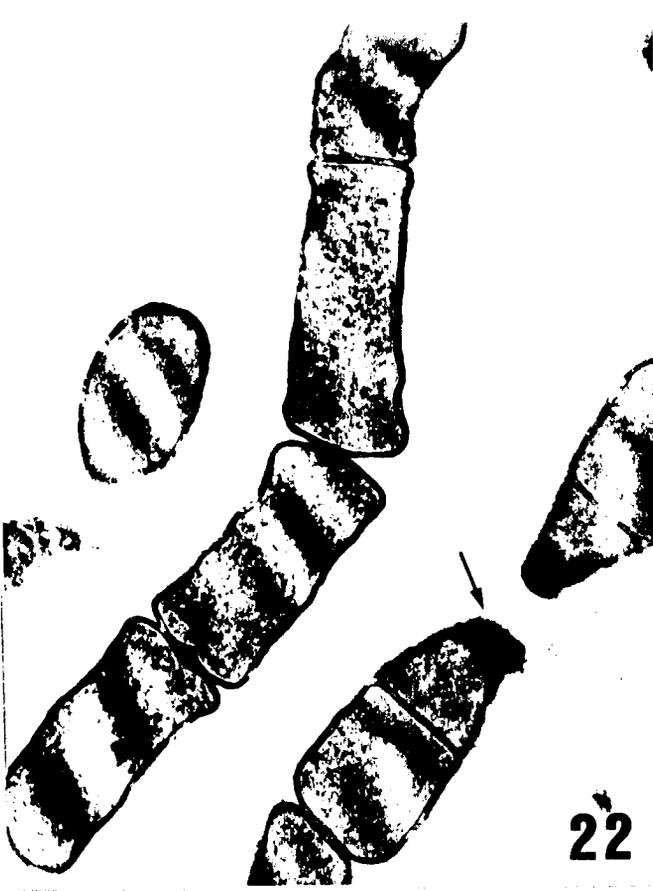
FOTO 17: *Lactobacillus acidophilus* NCFM"L" cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. Comparar com a micrografia número 15: NCFM"L" é resistente a 1,0% de sais biliares (5100x).



- FOTO 18: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. Notar normalidade e turgor das células (3500x).
- FOTO 19: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS observado ao MEV a 15 KV. Neste campo as células não túrgidas devem estar inativas (3500x).
- FOTO 20: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. São evidenciadas numerosas células em autó-lise (3500x).
- FOTO 21: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto comercial Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares observado ao MEV a 15 KV. A mesma observação se aplica: numerosas células em autó-lise (5100x).



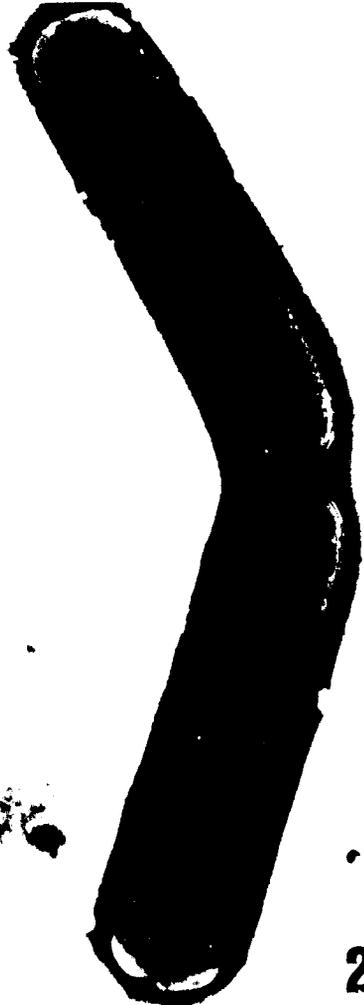
- FOTO 22: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em meio MRS agarizado, incluído em Epon e contrastado com acetato de uranila, observado ao MET (20000x). Notar as fímbrias da parede celular (↘).
- FOTO 23: *Lactobacillus acidophilus* CH2 cultivado em meio MRS agarizado, incluído em Epon e contrastado com acetato de uranila, observado ao MET (9460x), onde as fímbrias estão evidenciadas (↙).
- FOTO 24: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 0,3% de sais biliares, contrastado com PTA, observado ao MET (20000x). Notar a presença da camada externa.
- FOTO 25: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares, contrastado com PTA, observado ao MET (4320x). Notar a ausência da camada externa.
- FOTO 26: *Lactobacillus acidophilus* isolado do produto Bio (cultura BI) cultivado em caldo MRS com 1,0% de sais biliares, contrastado com PTA, observado ao MET (20000x). Notar a ausência da camada externa.



22



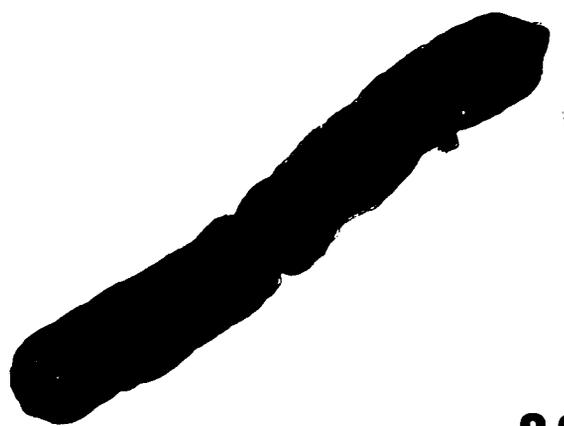
23



24



25



26

FOTO 27: Ilustrando a adesão de bactérias desconhecidas sobre a superfície dos enterócitos de ratos que não receberam *L. acidophilus*. Notar a emissão e adesão de extensos prolongamentos das bactérias sobre a mucosa intestinal ao MEV a 20 KV (4600x).

FOTO 28: Perfil de enterócitos normais de rato que recebeu *L. acidophilus* na dieta. Evidencia-se uma área com ruptura mecânica da vilosidade demonstrando enterócitos com morfologia normal e superfície intacta de microvilosidades. Estes ratos não demonstraram as bactérias da foto 27, mas também não possuíam *L. acidophilus* colonizadores. MEV a 20 KV (1600x).



5. CONCLUSÕES

1. Os probióticos comercializados (Bio e Biovita) recém-preparados ou armazenados mantêm uma quantidade adequada de células, sendo em torno de 10^7 a 10^8 ufc/g de produto num período de 25 dias.
2. No período de estudo (1991/92) os *L. acidophilus* de Biovita demonstraram o melhor crescimento com sais biliares até a concentração de 0,6% no meio de cultura.
3. As técnicas microscópicas empregadas demonstram aspectos parciais da morfologia. Entretanto a técnica de fluorescência com "Acridine Orange" (AO) aplicada aos bacilos retidos sobre membrana filtrante de policarbonato demonstrou-se rápida, econômica e eficaz, permitindo a avaliação metabólica das culturas.
4. Para efeito de detalhamento da estrutura celular conduziram-se amostras tratadas com sais biliares ou não tratadas para observações em Microscopia de Varredura. Sob esta técnica demonstraram-se prolongamentos da parede celular dos bacilos e mesmo dos estreptococos dos produtos para os quais não se acham explicações adequadas; embora seja evidente que a ausência de partição entre as células seja devida em parte à projeção das paredes nos ápices das células.
5. O detalhamento da superfície externa da parede celular observado na Microscopia de Transmissão demonstrou que uma camada contínua de proteínas e polissacárides revestia as células e que a mesma apresentava-se danificada nas células sensíveis à presença de sais biliares.

6. No ensaio com ratos jovens machos Wistar SPF não se obteve colonização intestinal de *L. acidophilus* provenientes dos produtos comerciais e administrados via dieta, embora promovessem crescimento ponderal adequado.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. Report of the AIN Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *The Journal of Nutrition* 107: 1340-1348, 1977.
- ARAUJO, F.L.; FONSECA, M.E.F. & RICCIARDI, I.D. A negative staining for pili visualization on bacteria S.B.M.E.: Simpósio sobre técnicas especiais de Microscopia Eletrônica aplicadas às Ciências Biomédicas. Caxambu, M.G., 10 e 11 de dezembro de 1986.
- BACK, J.P. & KROLL, R.G. The differential fluorescence of bacteria stained with acridine orange and the effects of heat. *J. Appl. Bacteriology*, 71(1):51-58 1991.
- BARROW, P.A.; BROOKER, B.E.; FULLER, R. & NEWPORT, M.J. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriology*, 48(1): 147-154, 1980.
- BEVERIDGE, T.J. Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial wall. *Int. Rev. of Cytology*, 72: 229-317, 1981.
- BHOWMIK, T.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Isolation and partial characterization of the surface protein of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Int. J. of Food Microbiology*, 2(5): 311-321, 1985.
- BRENNAN, M.; WANISMAIL, B.; RAY, B. Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial

- products. *J Food Protection.*, 46(10): 887-892, 1983.
- BRENNAN, M.; WANISMAIL, B.; JOHNSON, M.C. & RAY, B. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Protection.*, 49(1): 47-53, 1986.
- BROOKER, B.E. & FULLER, R. Adhesion of *Lactobacilli* to the chicken crop epithelium. *J. Ultrastr. Research*, 52(1): 21-31, 1975.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins Co., M.D., 1974, 1268p.
- CERELA-Centro de Referencia de lactobacilos: Seleccion y conservacion de fermentos lacticos de interes industrial. Tucuman, Argentina, 11 a 22 de noviembre de 1991.
- COLLINS, E.B. Enumeration of *Lactobacillus acidophilus* with the agar plate count. *J. Food Protection*, 41(6): 439-442, 1978.
- COLLINS, E.B. & ARAMAKI, K. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 63(3): 353-357, 1980.
- DALY, C. Biotechnology group meeting probiotics: fact or fiction?: Lactic acid bacteria and milk fermentations. *J. Chem. Technol. Biotechnology.*, 51(4): 544-548, 1991.
- FERREIRA, C.L. & GILLILAND, S.E. Bacteriocin involved in premature death of *Lactobacillus acidophilus* NCFM during growth at pH 6.0. *J. Dairy Sci.*, 71(2): 306-315, 1988.

- FRASER, T.W. & GILMOUR, A. Scanning Electron Microscopy preparation methods: their influence on the morphology and fibril formation in *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973). *J. Appl. Bacteriology*, 60(3): 527-533, 1986.
- FULLER, R. The importance of *Lactobacilli* in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Sci.*, 18: 85-94, 1977.
- FULLER, R. Epithelial attachment and other factors controlling the colonization of the intestine of the gnotobiotic chicken by *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriology*, 45(2): 389-395, 1978.
- FULLER, R.; BARROW, P.A. & BROOKER, B.E. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl. Env. Microbiology*, 35: 582-591, 1978.
- FULLER, R. Probiotics. *J. Appl. Bacteriology*, Symposium Supplement, 1S-7S, 1986.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriology*, 66(5): 365-378, 1989.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. & MORGAN, C.G. Detection of *Lactobacillus acidophilus* in feces of humans, pigs and chickens. *Appl. Microbiology*, 30(4): 541-545, 1975.
- GILLILAND, S.E. & SPECK, M.L. Deconjugation of bile acids by intestinal *Lactobacilli*. *Appl. Env. Microbiology*, 33(1): 15-18, 1977a.
- GILLILAND, S.E. & SPECK, M.L. Enumeration and identity of *Lactobacilli* in dietary products. *J.*

Food Protection., 40(11): 760-762, 1977b.

GILLILAND, S.E. & SPECK, M.L. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. J. Dairy Sci., 60(9): 1394-1398, 1977c.

GILLILAND, S.E. & SPECK, M.L. Use of the Minitex System for characterizing *Lactobacilli*. Appl. Env. Microbiology, 33(6): 1289-1292, 1977d.

GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans : Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Protection., 42(2): 164-167, 1979.

GILLILAND, S.E.; STALEY, T.E. & BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci., 67(12): 3045-3051, 1984.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R. & MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Env. Microbiology, 49(2): 377-381, 1985.

GILLILAND, S.E. & WALKER, D.K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemia effect in humans. J. Dairy Sci. 73(4): 905-911, 1990.

GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. Livraria Nobel, 10^a ed., Piracicaba, S.P., 1982, 430p.

GONZALEZ, S.; ALBARRACIN, G.; LOCASCIO de RUIZ PESCE, M. MALE, M.; APELLA, M.C.; PESCE de RUIZ HOLGADO, A. &

- OLIVER, G. Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 8: 349-354, 1990.
- GRUNEWALD, K.K. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.*, 47(6): 2078-2079, 1982.
- GUYOT, A. Les laits fermentés aux "bifidobactéries" et aux "lactobacilles acidophiles". *Le Lait et Nous*, 3: 15-17, 19, 21, 1990.
- HALL, J.L. *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plants Cells*. Biomedical Press, Amsterdam, New York, 1978.
- HANDLEY, P.S.; HARGREAVES, J. & HARTY, D.W.S. Ruthenium red staining reveals surface fibrils and a layer external to the cell wall in *Streptococcus salivarius* HB and adhesion deficient mutants. *J. of General Microbiology*, 134: 3165-3172, 1988.
- HARTY, D.W.S. & HANDLEY, P.S. Expression of the surface properties of the fibrillar *Streptococcus salivarius* HB and its adhesion deficient mutants grow in continuous culture under glucose limitation. *J. of General Microbiology*, 135 : 2611-2621, 1989.
- HERALD, P.J. & ZOTTOLA, E.A. The use of Transmission Electron Microscopy to study the composition of *Pseudomonas fragi* attachment material. *Food Microstructure*, 7(1): 53-57, 1988.
- HIGGINS, M.L.; COYETTE, J. & SHOCK, G.D. Sites of cellular autolysis in *L. acidophilus*. *J. Bacteriology*, 116(3): 1375-1382.

- HILL, B.M. Direct Epifluorescent Filter Technique.
Bulletin of I.D.F., 256: 20-24, 1991.
- HOBBIE, J.E.; DALEY, R.J. & JASPER, S. Use of
Nuclepore filters for counting bacteria by
Fluorescence Microscopy. *Appl. Env. Microbiology*,
33(5): 1225-1228, 1977.
- HOLCOMB, J.E.; FRANK, J.F. & McGregor, J.U. Viability
of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*
bifidum in soft-serve frozen yogurt. *Cult. Dairy*
Products. J., 26(3): 4-5, 1991.
- HOOD, S.K. & ZOTTOLA, E.A. Electron Microscopic study
of the adherence properties of *Lactobacillus*
acidophilus. *J. Food Sci.*, 52(3): 791-792, 805,
1987.
- HOOD, S.K. & ZOTTOLA, E.A. Effect of low pH on the
ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and
adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.*,
53(5): 1514-1516, 1988.
- HUIS in't Veld, J.H.J. & HAVENAAR, R. Probiotics and
health in man and animal. *J. Chem. Technol.*
Biotechnology, 51(4): 562-567, 1991.
- JOHNSON, J.L.; PHELPS, C.F.; CUMMINS, C.S.; LONDON, J.
& GASSER, F. Taxonomy of the *Lactobacillus*
acidophilus group. *Int. J. System. Bacteriology*,
30(1): 53-68, 1980.
- JUVEN, B.J.; MEINERSMANN, R.J. & STERN, N.J.
Antagonistic effects of *Lactobacilli* and *Pediococci*
to control intestinal colonization by human

- enteropathogens in live poultry. *J. Appl. Bacteriology*, 70(1): 95-103, 1991.
- KIM, H.S. & GILLILAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.*, 66(5): 959-966, 1983.
- KING-THOM CHUNG & STEVENS Jr., S.E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. in Microbiology.*, 18(3): 175-190, 1992.
- KLAENHAMMER, T.R. & KLEEMAN, E.G. Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Env. Microbiology*, 41(6): 1461-1467, 1981.
- KLAENHAMMER, T.R. Microbiological considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.*, 65(7): 1339-1349, 1982.
- KLAUSNER, R.D.; RENSWOUDE, J. Van; KEMPF, Ch. **Current Topics in Membranes and Transport : Membrane Structure and Function.** Orlando, U.S.A., Academic Press, INC, 1987, 310p.
- KLEEMAN, E.G. & KLAENHAMMER, T.R. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, 65(11): 2063-2069, 1982.
- LEWIS, S.J. ; GILMOUR, A. ; FRASER, T.W. & Mc Call, R.D. Scanning Electron Microscopy of soiled stainless steel inoculated with single bacterial cells. *Int. J. Food Microbiology*, 4 : 279-284, 1987

- MANN, G.V. & SPOERRY, A. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am. J. Clin. Nutrition*, 27: 464, 1974.
- MAYRA-MAKINEN, A.; MANNINEN, M. & GYLLENBERG, H. The adherence of lactic acid bacteria of the columnar epithelial cells of pigs and calves. *J. Appl. Bacteriology*, 55(2): 241-245, 1983.
- MUNCK, L. *Fluorescence Analysis in Foods*. New York, U.S.A., Longman Group UK, 1989, 289p.
- OVERDAHL, B.J. & ZOTTOLA, E.A. Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 74(4): 1196-1200, 1991.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; NADER DE MACIAS, M.E.; MARGNI, R.A.; OLIVER, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A. Enhancement of imune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 70(5): 919-926, 1987.
- PERDIGON, G.; NADER DE MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.A. Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Research*, 57: 255-264, 1990.
- PETTIPHER, G.L.; MANSELL, R.; McKINNON, C.H. & COUSINS, C.M. Rapid membrane filtration - Epifluorescent Microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl. Env. Microbiology*, 39(2): 423-429, 1980.

- RICHARDSON, G.H. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. Washington, D.C., 15th. ed., 1985, 412p.
- RODRIGUES, U.M. & KROLL, R.G. The Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT): increased selectivity, sensitivity and rapidity. **J. Appl. Bacteriology**, 59: 493-499, 1985.
- ROGOSA, M. & SHARPE, M.E. An approach to the classification of the *Lactobacilli*. **J. Appl. Bacteriology**., 22(3): 329-340, 1959.
- ROGINSKI, H. Fermented milks. **The Aust. J. Dairy Technology**., 43(2): 37-46, 1 988.
- SABIONI, N.S.S. & PINHEIRO, A.J.R. Leite acidofilo : Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros. **Rev. de Microbiologia**, 19(4): 393-398, 1988.
- SARRA, P.G.; CANTALUPO, R.; MASSA, S.; TROVATELLI, L.D. Colonization of the gastrointestinal tracts of conventional piglets by *Lactobacillus* strains. **J. Gen. Appl. Microbiology**, 37(2): 219-223, 1991.
- SHAHANI, K.M. & CHANDAN, R.C. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. **J. Dairy Sci.**, 62(10): 1685-1694, 1979
- SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, 268(1): 74-81, 1993.

SKINNER, F.A. & CARR, J.G. **Normal Microbial Flora of Man.** London, England, Acad. Press., 1974, 264p.

SPECK, M.L. Interactions among *Lactobacilli* and man. **J. Dairy Sci.**, 59(2): 338-340, 1976.

SPECK, M.L. Acidophilus food products. **Dev. Ind. Microbiology**, 19 : 95-101, 1978.