

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CAMPUS CURITIBANOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Laura Garbin Cappellaro

**POTENCIAL PROBIÓTICO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE GALINHAS
CRIADAS DE FORMA ORGÂNICA CONTRA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

Curitibanos

2022

Laura Garbin Cappellaro

**POTENCIAL PROBIÓTICO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE GALINHAS
CRIADAS DE FORMA ORGÂNICA CONTRA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em Medicina
Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Félix Schneider Bedin.

Curitiba

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Garbin Cappellaro, Laura
POTENCIAL PROBIÓTICO IN VITRO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
GALINHAS CRIADAS DE FORMA ORGÂNICA CONTRA CLOSTRIDIUM
PERFRINGENS / Laura Garbin Cappellaro ; orientadora, Aline
Félix Schneider Bedin, 2022.
31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2022.

Inclui referências.

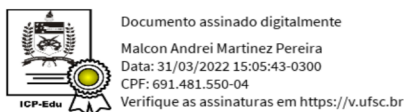
1. Medicina Veterinária. 2. Halo de Inibição . 3.
Microbiota. 4. Probióticos. I. Félix Schneider Bedin, Aline
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

Laura Garbin Cappellaro

**POTENCIAL PROBIÓTICO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE GALINHAS
CRIADAS DE FORMA ORGÂNICA CONTRA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

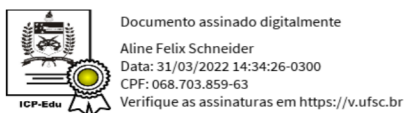
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Medicina Veterinária

Curitiba, 24 de março de 2022.



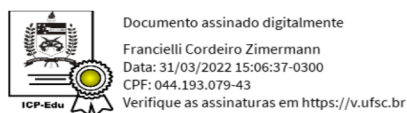
Prof. Dr. Malcon Andrei Martinez Pereira
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a Aline Félix Schneider Bedin
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dr^a Caroline Pissetti
Avaliadora
Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal – CEDISA



Prof^a. Dr^a Francielli Cordeiro Zimermann
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que estiveram sempre ao meu lado durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a vida, por simplesmente me permitir desfrutar de momentos tão maravilhosos e ter tido a oportunidade de dividi-los com pessoas tão especiais. Além disso, agradeço também pelos momentos ruins e difíceis, estes também foram essenciais para o meu desenvolvimento.

Agradeço aos meus pais, Celso Cappellaro e Eliane Garbin Cappellaro, por serem meus exemplos de dedicação, perseverança e amor.

Ao meu pai, agradeço por todos os conselhos e por todo auxílio ao longo da minha jornada. Segundo ele, a “sorte” depende das oportunidades aliadas com as competências de cada um. A minha “sorte”, posso dizer, então, que foi ter um pai que lutou muito para dar boas oportunidades aos filhos e lhes ensinou a importância de serem competentes para alcançarem os próprios sonhos.

À minha mãe, agradeço por todo carinho e dedicação. Mesmo de longe, ela sempre me protegeu e continua protegendo com muitas orações e inúmeras velas acesas para iluminar o meu caminho. Minha mãe é o meu exemplo de amor e de entrega.

Ao meu irmão, Gabriel Garbin Cappellaro, agradeço por sempre estar ao meu lado e por sempre aceitar fazer parte das minhas aventuras e “shows de teatro” quando criança. Estarei sempre aqui quando precisar.

A minha família, avós, tios e primos, agradeço por serem a minha base e por me ajudarem a construir o meu caráter e a pessoa que eu sou hoje.

Agradeço imensamente a minha família de alma que me acolheu quando fui para o Canadá. Meu pai adotivo, François Godbout, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. Minha mãe adotiva, Chantal Moffete, por todo carinho em cada detalhe para me receber em sua casa. Minha irmã adotiva, Celia Godbout, por me acolher e me mostrar as belezas de Montréal. Tenho certeza que, se anjos existem, vocês são os anjos que apareceram na minha vida.

Agradeço às minhas amigas e irmãs da UFSC, Ana Paula Teixeira, Ana Clara Teixeira, Bianca Agador, Laura Scaldaferrri, Letícia Post e Sylvia Farias por todos os momentos bons, pelas histórias e pela parceria. Graças a vocês, essa caminhada se tornou mais leve e divertida.

Aos meus amigos e irmãos de Curitiba, Gabriel Santos, Hyago Chaher, Jéssica Casali, Matheus Gatner, Rafaela Scheffer e Vinícius Neves, agradeço por entrarem na minha vida e por me mostrarem que amizade verdadeira não precisa de muito tempo para ser construída.

À minha amizade de mais de 15 anos, Heloisa Pellegrini, agradeço por estar sempre do meu lado, mesmo com a distância e com as direções tão diferentes que tomamos.

Ao meu namorado, Rafael Francesco, obrigada por todo o carinho e por ser meu porto seguro. Obrigada também por estar do meu lado nos momentos mais difíceis e por sempre acreditar em mim e me motivar.

A minha orientadora, Professora Aline Schneider Bedin, por ter me guiado e ser meu exemplo de mulher e profissional. Agradeço por todos os conselhos que me ajudaram tanto em decisões importantes na minha vida.

Ao meu Professor orientador do estágio, Marcio Costa, por confiar em mim e me proporcionar uma das melhores experiências profissionais da minha vida.

Aos meus amigos do Canadá e do estágio, Aissan Souidi, Esdras Corrêa, Julia Arantes, Jean Ramos, Karine Lamarre, Laura Franco, Laura Guerrero, Lila Maduro, Marêva Bleuzé, Pedro Henrique Rocha, Ryota Watanabe, Sabrina Marangoni e Vitória Régia Campelo, por desde o primeiro momento, me acolherem e nunca deixarem eu me sentir sozinha.

Agradeço a instituição MITACS por me proporcionar condições de realizar o meu estágio final em uma instituição de ensino de excelência.

E por fim, agradeço a UFSC, pela oportunidade de estudar em um ensino público também de excelência e com profissionais extremamente capacitados que proporcionaram a realização do meu sonho de ser Médica Veterinária.

Quem acredita sempre alcança.

Renato Russo

RESUMO

A microbiota intestinal modula a resposta imune local e sistêmica, que é essencial para resistir a doenças. Portanto, um bom funcionamento da microbiota intestinal é fundamental para a manutenção da saúde. Alterações na composição normal da microbiota (disbiose) estão associadas à fisiopatologia de várias doenças. Os probióticos estão sendo utilizados para regular a microbiota intestinal, equilibrar distúrbios gastrointestinais, prevenir e tratar doenças, e, também, atuam como imunomoduladores. Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar e testar bactérias, isoladas de galinhas criadas de forma orgânica, com potencial probiótico para desenvolvimento de um novo probiótico para frangos de corte. Cinco bactérias isoladas e sequenciadas (*Shigella boydii*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella sonnei* e *Enterococcus hirae*) foram testadas contra duas cepas de *Clostridium perfringens* (patogênica e comensal). Pelo teste *in vitro* realizado, utilizando Ágar Muller Hinton II e discos estéreis, nenhuma das bactérias apresentou halos de inibição e capacidade de inibir o crescimento das cepas de *Clostridium perfringens*. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que estas bactérias possam apresentar um potencial probiótico contra outros agentes patogênicos, e portanto, faz-se necessário a continuidade da pesquisa para elucidar essas questões.

Palavras-chave: Halo de Inibição. Microbiota. Probióticos.

ABSTRACT

The gut microbiota modulates the local and systemic immune response, which is essential to resist disease. Therefore, a good functioning of the intestinal microbiota is essential for the maintenance of health. Changes in the normal composition of the microbiota (dysbiosis) are associated with the pathophysiology of several diseases. Probiotics are being used to regulate the intestinal microbiota, balance gastrointestinal disorders, prevent and treat diseases, and also act as immunomodulators. Thereby, the objective of this study is to identify bacteria, isolated from organically raised chickens, with probiotic potential for the development of a new product for broilers. Five isolated and sequenced bacteria (*Shigella boydii*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella sonnei* and *Enterococcus hirae*) were tested against two strains of *Clostridium perfringens* (pathogenic and commensal). In the in vitro test performed using Muller Hinton II Agar and sterile discs, none of the bacteria showed inhibition halos and the ability to inhibit the growth of *Clostridium perfringens* strains. However, the possibility that these bacteria may have a probiotic potential against other pathogens cannot be ruled out.

Keywords: Inhibition halo. Microbiota. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cultura de <i>Clostridium perfringens</i> , cepa comensal (A) e cepa patogênica (B) em ágar Muller Hinton II.	21
Figura 2- Cultura de <i>Shigella boydii</i> (A), <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (B), <i>Escherichia fergusonii</i> (C), <i>Shigella sonnei</i> (D) e <i>Enterococcus hirae</i> (E) em ágar Muller Hinton II.	21
Figura 3- Aparelho utilizado para escala de MacFarland utilizadas para determinar a concentração das cepas de <i>Clostridium perfringens</i>	22
Figura 4- Diluição seriada de <i>Shigella boydii</i> (A), <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (B), <i>Escherichia fergusonii</i> (C), <i>Shigella sonnei</i> (D) e <i>Enterococcus hirae</i> (E) em meio PCA.....	22
Figura 5- Modelo para realização do teste <i>in vitro</i> . <i>Shigella boydii</i> (A), <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (B), <i>Escherichia fergusonii</i> (C), <i>Shigella sonnei</i> (D) e <i>Enterococcus hirae</i> (E) em ágar Muller Hinton II.....	23
Figura 6- Resultado do teste <i>in vitro</i> das bactérias <i>Shigella boydii</i> (A), <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (B), <i>Escherichia fergusonii</i> (C), <i>Shigella sonnei</i> (D) e <i>Enterococcus hirae</i> (E) em ágar Muller Hinton II.....	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Bactérias identificadas por sequenciamento genético a partir de amostras de ceco de galinhas orgânicas.....	20
Quadro 2- Cepas utilizadas de <i>Clostridium perfringens</i>	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL – Bactérias ácido lácticas

BHI – Brain Heart Infusion Broth

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Ppm – Parte por milhão

TSA – Agar Triptona de Soja

UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS	20
3.2	REATIVAÇÃO BACTERIANA	20
3.3	CULTURA BACTERIANA.....	21
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.....	22
3.5	TESTE <i>IN VITRO</i>	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5	CONCLUSÃO.....	27
	REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

A caracterização de comunidades bacterianas foi recentemente revolucionada pelo desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração, que permitiram a descoberta de muitos novos táxons bacterianos (ECKBURG *et al.*, 2005) concomitantemente, novas técnicas de cultivo têm sido desenvolvidas para melhorar a recuperação bacteriana, especialmente para atingir espécies raras (LAGIER *et al.*, 2015) Estes métodos, visam reconstituir da melhor forma o ambiente intestinal para permitir o crescimento de espécies difíceis de cultivar (LAU *et al.*, 2016).

O trato gastrointestinal representa um foco de estudos da produção animal, pois é responsável pela absorção de nutrientes e, é o local de ação de importantes patógenos causadores de doenças. O trato gastrointestinal abriga um ecossistema complexo composto por milhares de diferentes espécies de microrganismos, coletivamente chamados de “microbiota”. A microbiota intestinal desempenha um papel importante no desenvolvimento da mucosa intestinal, na regulação do sistema imunológico local e sistêmico e na extração de energia dos alimentos (WOSTMANN *et al.*, 1983; COX *et al.*, 2014). Além disso, o trato gastrointestinal do frango abriga uma microbiota muito diversificada que auxilia na decomposição e digestão dos alimentos e compreende mais de 900 espécies de bactérias (STANLEY *et al.*, 2014).

Uma microbiota normal, composta por várias centenas de espécies comensais, também desempenha um papel importante na proteção do hospedeiro contra bactérias patogênicas, o que é alcançado pela competição por alimentos e por sítios de ligação ao longo da mucosa e pela produção de muitas substâncias que podem inibir o crescimento de certas espécies bacterianas (WALSH *et al.*, 2014). Além disso, a microbiota intestinal modula a resposta imune local e sistêmica, que é essencial para resistir a doenças (THURSBY; JUGE, 1936). Alterações na composição normal da microbiota (disbiose) estão associadas à fisiopatologia de várias doenças. Portanto, um bom funcionamento da microbiota intestinal é fundamental para a manutenção da saúde (MAZMANIAN *et al.*, 2005).

Atualmente, probióticos são definidos como microrganismos vivos com capacidade de conferir benefícios à saúde de seu hospedeiro. Os probióticos estão sendo utilizados para regular a microbiota intestinal, equilibrar distúrbios gastrointestinais, prevenir e tratar doenças, e, também, atuam como imunomoduladores (ALVIM, 2015).

Os probióticos também são amplamente utilizados em humanos, mas sua maior limitação é sua natureza transitória, que requer administração contínua. Nos estudos preliminares do grupo de pesquisa orientado pelo Prof. Dr. Marcio Costa, da Universidade de Montréal, observou-se que é possível colonizar o trato gastrointestinal de pintos de um dia, com espécies bacterianas que permanecerão até a idade adulta (dados não publicados).

Portanto, a seleção da espécie certa e da janela de tempo adequada é necessária para a colonização bem-sucedida do trato intestinal das galinhas e prevenção a doenças como, por exemplo, a clostridiose. O *Clostridium perfringens* tipo A, é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia que pode causar uma enterotoxemia necrótica, especialmente em sistemas intensivos de frangos de corte, com mais de quatro semanas de idade. Além disso, é potencialmente zoonótica e causadora de altas perdas econômicas devido à mortalidade e diminuição nos parâmetros de produção (MEJÍA *et al.*, 2008).

A galinha doméstica é um organismo modelo comum para pesquisa biológica humana e, claro, também forma a base de uma indústria global de proteínas (OAKLEY *et al.*, 2014). Desta forma, um novo probiótico com potencial para aumentar a regulação do sistema imunológico e aumentar a absorção de nutrientes contribuiria para o aumento da produção avícola. Com isso, realizou-se a seleção e sequenciamento de bactérias presentes no ceco de galinhas criadas de forma orgânica, com o intuito de obter uma grande diversidade bacteriana para compor um novo probiótico.

Após a seleção e identificação dessas bactérias, o objetivo deste trabalho foi realizar um teste *in vitro* para verificar o potencial probiótico, de cada espécie identificada, contra o agente *Clostridium perfringens*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar bactérias previamente selecionadas e sequenciadas e, testar a capacidade das mesmas de inibir o crescimento do agente *Clostridium perfringens*, contribuindo com parte de um projeto de doutorado, para o desenvolvimento de um novo probiótico para frangos de corte.

1.1.2 Objetivos Específicos

Identificar as bactérias previamente sequenciadas e determinar a concentração após a reativação e cultura para realização do teste *in vitro*;

Testar, *in vitro*, as bactérias *Shigella boydii*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella sonnei* e *Enterococcus hirae* contra duas cepas de *Clostridium perfringens* (patogênica e comensal);

Analisar os resultados obtidos para determinar o uso destas bactérias para produção de um probiótico para frangos de corte.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento de tecnologias empregadas na indústria avícola tem aumentado a produtividade. Porém, com a alta seleção genética, estes animais tornaram-se mais sensíveis a fatores estressantes como alta densidade, variações na temperatura e desafios nutricionais. Devido a isso, a microbiota destes animais também foi afetada, diminuindo a sua diversidade, o que implica diretamente na absorção de nutrientes e no desenvolvimento do sistema imunológico destes animais. Além disso, devido ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos, busca-se por alternativas com o intuito de substituir o uso dos antibióticos (GHIOTTI, 2015).

Desta forma, nos últimos anos aumentou-se o interesse pela utilização de microrganismos que possuem efeitos benéficos, com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir ou tratar doenças (BARBOSA *et al.*, 2011). As culturas probióticas provaram ter fortes potenciais antimicrobianos que podem ser usados para prevenção e tratamento de várias doenças gastrointestinais. Por exemplo, o efeito inibitório *in vitro* de *Lactobacilli spp.* foi demonstrado contra isolados de *Clostridium perfringens* (MONTEIRO *et al.*, 2019). No entanto, devido às limitações técnicas, essas cepas raramente atingem a produção comercial. Há uma falta de dados científicos comparando a atividade anti-clostridial de diferentes cepas probióticas comerciais (HAMAD *et al.*, 2020).

Em países que pararam de usar antibióticos como promotores de crescimento, a incidência de enterite necrótica, associada a *Clostridium perfringens*, em aves aumentou (IMMERSEL *et al.*, 2004). A *Clostridium perfringens* é uma bactéria patogênica Gram-positiva, em forma de bastonete, anaeróbia, formadora de esporos encontrada como um habitante normal do intestino das aves, capaz de produzir até 18 toxinas e enzimas extracelulares (HAMAD *et al.*, 2020).

O intestino de aves saudáveis normalmente contém aproximadamente 10^4 UFC/g de *Clostridium perfringens*. No entanto, fatores predisponentes, como danos pré-existentes ao epitélio intestinal por coccídios (*Eimeria spp.*), vírus da doença infecciosa da Bursa, altos níveis alimentares de certos cereais e farinha de peixe, distúrbios da microbiota intestinal normal, superlotação ou uma variedade de manejo e condições climáticas, podem favorecer a proliferação de *C. perfringens* para atingir uma concentração crítica de cerca de 10^7 a 10^9 UFC/g. Nessa concentração, a *C. perfringens* produz toxinas que induzem danos na

mucosa do intestino delgado e cecos de frangos e perus, resultando em enterite necrótica de forma clínica (FASINA; LILLEHOJ, 2019).

A enterite necrótica e a forma subclínica da infecção por *C. perfringens* em aves são causadas por *C. perfringens* tipo A, que produz a toxina alfa e, em menor grau, pelo tipo C, que produz tanto a toxina alfa quanto a toxina beta. Algumas cepas de *C. perfringens* tipo A produzem uma enterotoxina no momento da esporulação e são responsáveis por doenças transmitidas por alimentos em humanos (IMMERSEL et al., 2004).

Desta forma, a clostridiose também é uma doença de caráter zoonótico. Em seres humanos, uma vez que a população bacteriana de *Clostridium perfringens* atinge a densidade maior do que 10^4 UFC/g, é desencadeada a produção de toxinas que induzem a intoxicação alimentar por *C. perfringens* tipo A, que representa a segunda doença de origem alimentar mais comum nos países em desenvolvimento (HAMAD et al., 2020).

O controle e a prevenção devem e ser realizados com manejo ambiental adequado, evitando a superlotação das granjas e o excesso de umidade da cama. O uso de probióticos que colonizam o trato intestinal, reduzem o pH e produzem bactericidas, também reduzem a severidade da enterite necrótica (BIGNARDE et al., 2008).

Há uma quantidade considerável de pesquisas sobre os efeitos dos probióticos na composição da microbiota, integridade da mucosa e imunomodulação para controlar a inflamação, visando melhorar a eficiência e o desempenho alimentar e reduzir infecções patogênicas sem o uso de antibióticos em aves (TARRADAS et al., 2020).

Bactérias benéficas desempenham um papel fundamental na limitação do contato direto de bactérias patogênicas com o epitélio por exclusão competitiva por nutrientes e pela superfície do lúmen. Os probióticos também têm a capacidade de modular a ativação da via inflamatória, interagindo com as células epiteliais e células imunes intestinais. Essas células detectam fragmentos microbianos através de receptores. Por exemplo, os receptores *Toll-like*, são uma classe importante de receptores de reconhecimento de padrões e que reconhecem tanto antígenos derivados da microbiota quanto antígenos de patógenos invasores. Enquanto eles mantêm a tolerância imunológica às comunidades de bactérias comensais residentes, eles montam respostas imunes robustas contra patógenos (TARRADAS et al., 2020).

Até o momento, as pesquisas com probióticos têm se concentrado em decifrar os efeitos imunomoduladores que cada cepa bacteriana induz no hospedeiro, com o objetivo de melhorar a produtividade, eficiência alimentar, saúde e bem-estar (TARRADAS et al., 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS BACTÉRIAS

Após o sequenciamento genético das amostras extraídas do ceco de galinhas orgânicas, foi possível identificar cinco bactérias a nível de espécie (Quadro 1). As bactérias foram conservadas a -20°C em solução de glicerol 30% e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI).

Quadro 1- Bactérias identificadas por sequenciamento genético a partir de amostras de ceco de galinhas orgânicas.

Nome científico
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Shigella boydii</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>Shigella sonnei</i>

Fonte: Autor, 2022.

Para realização do teste, duas cepas de *Clostridium perfringens* também foram utilizadas, sendo uma delas uma cepa patogênica e a outra cepa comensal (Quadro 2).

Quadro 2- Cepas utilizadas de *Clostridium perfringens*.

Classificação	Identificação	Informações
Comensal	Desch7-1env	netB -, Perfrin +, Bacteriocin +, Adhesin +
Patogênica	38G	netB +

Fonte: Autor, 2022.

3.2 REATIVAÇÃO BACTERIANA

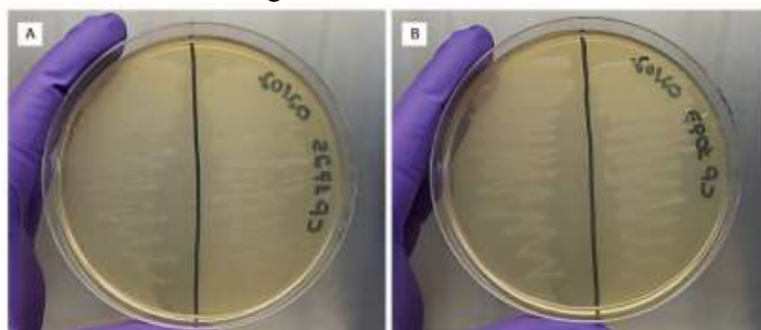
As cinco bactérias identificadas foram reativadas em caldo MRS e as cepas patogênicas de *Clostridium perfringens* foram reativadas em *Trypsoy Agar* (TSA) com 5% de sangue. Todas as bactérias foram incubadas na câmara de anaerobiose (BactronEZ), durante 24 horas.

3.3 CULTURA BACTERIANA

Realizou-se um repique das bactérias previamente reativadas, utilizando-se os mesmos meios de cultivo para realizar o teste. As bactérias ficaram incubadas na câmara de anaerobiose durante 16 horas.

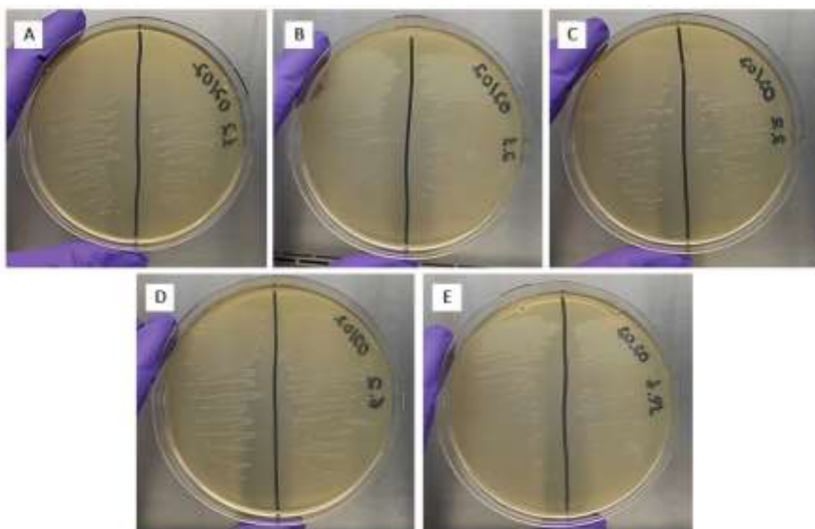
Além disso, antes de realizar o teste *in vitro*, todas as bactérias utilizadas no estudo, inclusive as cepas de *Clostridium perfringens*, também foram testadas em ágar Muller Hinton II, para verificar o crescimento delas neste meio (Figura 1 e 2).

Figura 1- Cultura de *Clostridium perfringens*, cepa comensal (A) e cepa patogênica (B) em ágar Muller Hinton II.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 2- Cultura de *Shigella boydii* (A), *Ligilactobacillus salivarius* (B), *Escherichia fergusonii* (C), *Shigella sonnei* (D) e *Enterococcus hirae* (E) em ágar Muller Hinton II.



Fonte: Autor, 2022.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Foi determinada a concentração com base na escala 0,5 de Macfarland para *Clostridium perfringens* (Figura 3) e realizou-se diluição seriada para determinar a concentração das bactérias selecionadas (Figura 4).

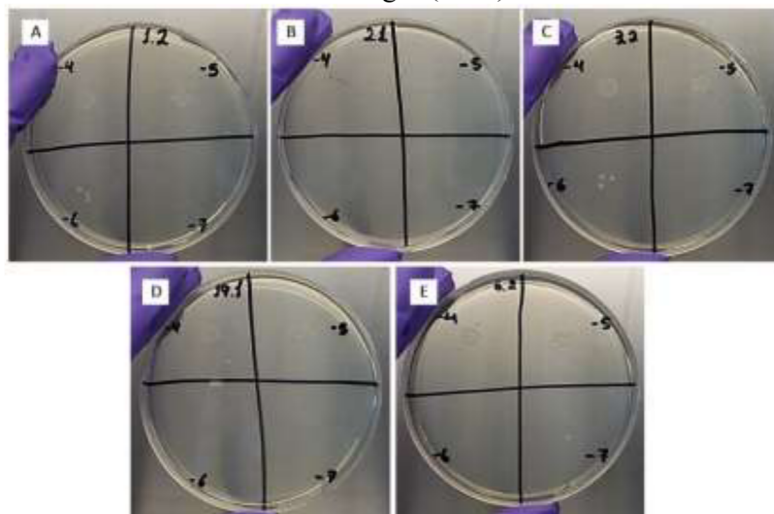
Determinou-se a concentração das bactérias como sendo, *Shigella boydii* (A) na concentração de 3×10^8 UFC/mL, *Ligilactobacillus salivarius* (B) como sendo menor que 10^4 UFC/mL, *Escherichia fergusonii* (C) com 3×10^8 UFC/mL, *Shigella sonnei* (D) na concentração de $1,1 \times 10^8$ UFC/mL e *Enterococcus hirae* (E) com a concentração de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL.

Figura 3- Aparelho utilizado para escala de MacFarland utilizadas para determinar a concentração das cepas de *Clostridium perfringens*.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 4- Diluição seriada de *Shigella boydii* (A), *Ligilactobacillus salivarius* (B), *Escherichia fergusonii* (C), *Shigella sonnei* (D) e *Enterococcus hirae* (E) em meio Plate Count Agar (PCA).

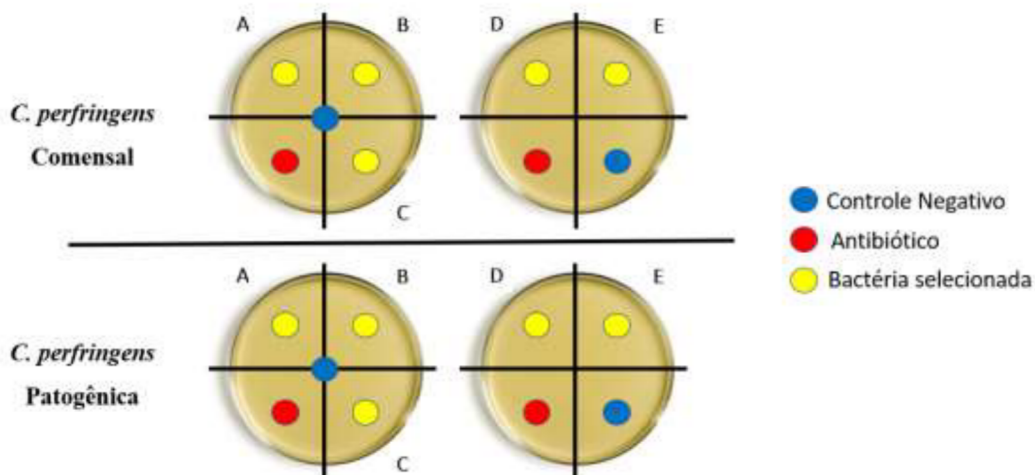


Fonte: Autor, 2022.

3.5 TESTE *IN VITRO*

Para realização do teste *in vitro*, utilizou-se discos estéreis e placas de petri com Ágar Muller Hinton II. Pipetou-se 100µL da solução de *Clostridium perfringens* (determinada pela escala de MacFarland) e distribuiu-se na placa utilizando uma Alça de Drigalski. Após dez minutos, aplicou-se os discos estéreis com o auxílio de uma pinça. As amostras foram distribuídas de acordo com o modelo desenvolvido (Figura 5). Foi pipetado, em cada disco estéril, uma amostra de 10µL de cada cultura realizada em caldo MRS. Todos os testes foram realizados em duplicatas e possuíam controle negativo (caldo MRS) e um antibiótico (Monensina na concentração de 64 ppm) para verificar a formação do halo de inibição. As placas foram incubadas em uma câmara de anaerobiose (BactronEZ) durante 48 horas.

Figura 5- Modelo para realização do teste *in vitro*. *Shigella boydii* (A), *Ligilactobacillus salivarius* (B), *Escherichia fergusonii* (C), *Shigella sonnei* (D) e *Enterococcus hirae* (E) em ágar Muller Hinton II.



Fonte: Autor, 2022

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente avaliou-se o crescimento uniforme do *Clostridium perfringens* na placa. Com uma boa formação do tapete, foi possível identificar a formação de um halo de inibição no disco que continha o antibiótico.

O teste baseia-se em uma análise qualitativa, ou seja, para avaliar o potencial probiótico das bactérias, observou-se a formação ou não de um halo de inibição. Para determinar se a bactéria possui a capacidade de inibir o crescimento do *Clostridium perfringens*, deve haver um halo de inibição ao redor do disco, independentemente do tamanho, como análise inicial.

A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias do ácido láctico (BAL), Gram-positivas, geralmente catalase-negativas, não esporulantes, anaeróbios estritos ou crescimento facultativo. Normalmente, os probióticos incluem espécies BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* e outros (ALVIM, 2015).

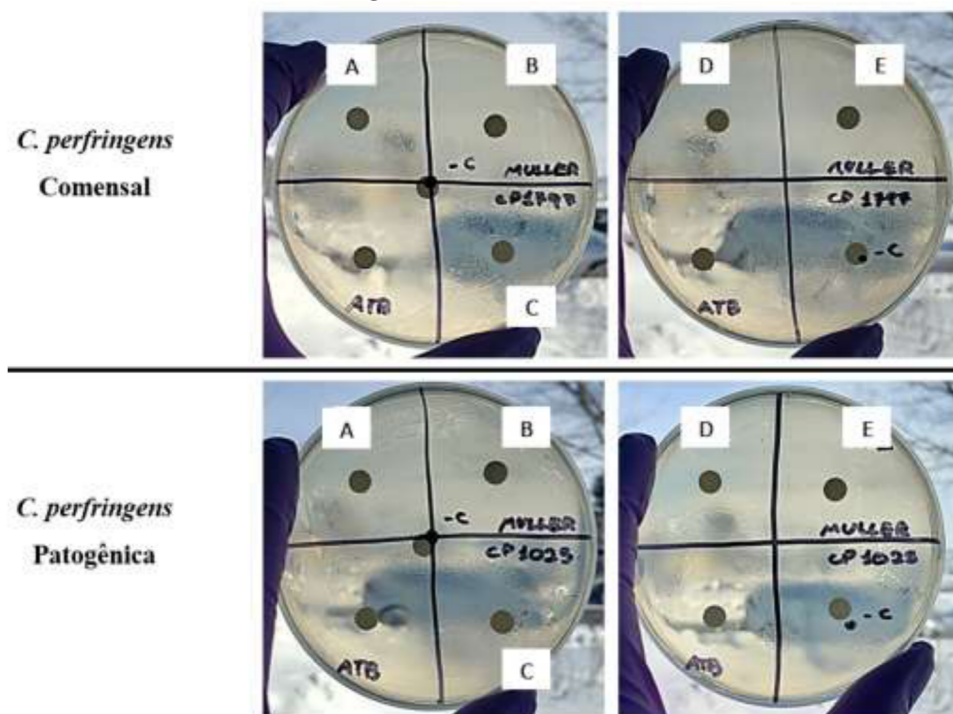
De todas as bactérias sequenciadas, as bactérias *Ligilactobacillus salivarius* e *Enterococcus hirae* compreendem o grupo BAL. Porém, não necessariamente as bactérias que constituem esse grupo, apresentam um potencial probiótico. No teste realizado, nenhuma das duas bactérias do grupo BAL apresentaram halo de inibição contra as cepas de *Clostridium perfringens* (Figura 6).

As bactérias *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii*, e *Shigella sonnei*, que também foram testadas, são pertencentes ao filo Proteobacteria. Naturalmente, o grupo de bactérias abundantes presente no ceco de frangos de corte são do filo Firmicutes, *Bacteroides*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (BRIAN *et al.*, 2014). As bactérias *Ligilactobacillus salivarius* e *Enterococcus hirae* pertencem ao Filo Firmicutes, ou seja, também constituem a microbiota normal do ceco de frangos de corte.

Apesar de todas as bactérias testadas compreenderem naturalmente a microbiota do ceco de galinhas, nenhuma delas apresentou potencial para inibir o crescimento das duas cepas testadas de *Clostridium perfringens* (Figura 6).

Apenas foi possível observar um halo de inibição no disco em que foi aplicado o antibiótico Monensina (64 ppm). Isso indica que houve uma boa formação e crescimento do *Clostridium perfringens* no Ágar. Não houve nenhum halo de inibição no controle negativo, indicando que não houve nenhuma contaminação do caldo MRS (Figura 6).

Figura 6- Resultado do teste *in vitro* das bactérias *Shigella boydii* (A), *Ligilactobacillus salivarius* (B), *Escherichia fergusonii* (C), *Shigella sonnei* (D) e *Enterococcus hirae* (E) em ágar Muller Hinton II.



Fonte: Autor, 2022

O sequenciamento genético das bactérias apenas possibilitou a identificação das bactérias a nível de espécie pois amplificou-se apenas o gene rRNA 16S da bactéria e não o seu DNA por completo. Diferentes cepas bacterianas, dentro de uma mesma espécie, podem apresentar diferentes genes que apresentam diferentes funcionalidades e efeitos. Isso também indica que há a possibilidade de que, especificamente, a cepa das bactérias testadas neste estudo não apresentavam o gene com o potencial probiótico de inibir o crescimento do *Clostridium perfringens*. Para realizar a classificação da bactéria como patogênica, comensal ou probiótica, muitas vezes se faz necessário a identificação da cepa bacteriana. Alguns estudos, por exemplo, apresentam a bactéria *Enterococcus hirae* causando depressão do crescimento em galinhas jovens (FARROW; COLLINS, 1985). Porém, um outro estudo realizado, demonstrou que a cepa *Enterococcus hirae* ST57ACC, foi capaz de inibir o crescimento de *Listeria spp* (CAVICCHIOLI, 2018).

Outros estudos que testaram diferentes cepas de bactérias também apresentaram bons resultados, demonstrando melhora no desempenho e na saúde intestinal de frangos de corte quando expostos ao agente *Clostridium perfringens*. Por exemplo, a cepa *L. salivarius* 3D

também apresentou efeito protetor contra a infecção de *C. perfringens* em galinhas (DEC *et al.*, 2014).

Outras bactérias também possuem o efeito probiótico para combater a clostridiose. A bactéria *Bacillus subtilis*, possui um fator anticlostridial que pode inibir o crescimento do *C. perfringens* (TEO; TAN, 2005). A bactéria *L. acidophilus* também mostrou resultados positivos quando suplementada a dieta de frangos de corte. A suplementação de *L. acidophilus* ajudou a restaurar a comunidade microbiana afetada por *C. perfringens* (LI *et al.*, 2017).

Além disso, a concentração de bactérias probióticas também interfere diretamente nos resultados. A concentração ideal de probióticos não é apenas necessária para o estabelecimento e subsequente proliferação no intestino, mas também para exercer vários efeitos benéficos, incluindo a estimulação da atividade imunológica. A dose de probióticos geralmente é selecionada com base em sua capacidade de aumentar o crescimento e a proteção no hospedeiro. Por exemplo, determinou-se que a dose efetiva da cepa probiótica pertencente à espécie *Bacillus* é de 2×10^8 UFC/mL, nas quais elas registraram a menor porcentagem de mortalidade em trutas durante o estudo de desafio (NAYAK, 2010).

Desta forma, a concentração das bactérias utilizadas neste estudo pode não ser suficientes para inibir as cepas de *Clostridium perfringens*, porém concentrações maiores podem apresentar um resultado diferente. São necessários mais estudos, com a continuidade da linha de pesquisa, para elucidar diversas questões a serem respondidas sobre o efeito probiótico desse grupo de bactérias, frente ao *Clostridium perfringens*.

5 CONCLUSÃO

No teste realizado, as bactérias *Shigella boydii*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella sonnei* e *Enterococcus hirae*, nas concentrações utilizadas, não inibiram o crescimento das cepas, tanto patogênica quanto comensal, de *Clostridium perfringens*. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que estas bactérias possam apresentar um potencial probiótico *in vitro* contra outros agentes patogênicos ou que diferentes concentrações poderiam ser capazes de inibir o crescimento do agente *Clostridium perfringens*.

Outras bactérias, provenientes do ceco de galinhas criadas de forma orgânica, devem ser isoladas e testadas para verificar o potencial probiótico. Desta forma será possível produzir um probiótico eficiente para frangos de corte contra a clostridiose.

REFERÊNCIAS

ALVIM, Luige Biciati. Segurança e Efeito Probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 Isolada de Suíno na Infecção Experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos. **Pós graduação genética-UFMG**. 2015.

BARBOSA, Flávio H; BARBOSA, Larrisa J; NICOLI, Jacques, R. Avaliação da capacidade probiótica de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus* da microbiota fecal de seres humanos contra *Clostridium perfringens*. **Estação Científica (UNIFAP)**. v. 1, n. 1, p. 75-88, 2011.

BIGNARDE, Janaína M; MONTEIRO, Maria Eduarda; BERTOZZO, Danilo T; FREITAS, Rogério E; PEREIRA, R. Enterite Necrótica em Aves. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Jul, 2008

CAVICCHIOLI, Valeria Quintana. Caracterização dos isolados bacteriocinogênicos *Enterococcus hirae* e *Pediococcus pentosaceus* obtidos de queijo artesanal e suas bacteriocinas. **Universidade Federal de Viçosa**. v. 1. 171p. 2018.

COX, Laura M; YAMANISHI, Shingo; SOHN, Jiho; ALEKSEYENKO, Alexander V; LEUNG, Jacqueline M; CHO, Ilseung; KIM, Sungheon; LI, Huilin; GAO, Zhan; MAHANA, Douglas; RODRIGUEZ, Jorge G Zárate; ROGERS, Arlin B; ROBINE, Nicolas; LOKE, P'ng; BLASER, Martin J. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. **National Library of medicine**. v. 158, n. 4, p. 705-721. Ago 2014.

DEC, Marta; PUCHALSKI, Andrzej; URBAN-CHMIEL, Renata; WERNICKI, Andrzej. Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. **Poultry Science**. v. 93. p. 2464 – 2472, 2014.

ECKBURG, Paul B; BIK, Elisabeth M; BERNSTEIN Charles N; PURDOM, Elizabeth; DETHLEFSEN Les; SARGENT, Michael; GILL, Steven R; NELSON, Karen E; RELMAN, David A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**. v.308. p. 1635 – 1638, 2005.

FARROW, John A E; COLLINS, Matthew D. Enterococcus hirae, a New Species That Includes Amino Acid Assay Strain NCDO 1258 and Strains Causing Growth Depression in Young **Chickens. International Journal of systematic bacteriology**. p. 73 – 75. Jan 1985.

FASINA, Yewande O; LILLEHOJ, Hyun S. Characterization of intestinal immune response to Clostridium perfringens infection in broiler chickens. **ELSEVIER**. v. 98, p. 188-198. Jan, 2020.

GIOTTI, André L. Uso de probióticos em situação de desafio nutricional e sanitário em frangos de corte. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Mar, 2015.

HAMAD, Gamal M; ABDELMOTILIB, Neveen M; DARWISH, Amira M; ZEITOUN, Ahmed M. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of Clostridium perfringens poultry meat infection in Egypt. **ELSEVIER**. 2020.

IMMERSEL, Filip; DE BUCK, Jeroen; PASMANS, Frank; HUYGHEBAERT, Gerard; HAESEBROUCK, Freddy; DUCATELLE, Richard. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathol**. Dez, 2004.

LAGIER, Jean Christophe; HUGON, Perrine; KHELAIFFIA, Saber; FOURNIER, Edouard; SCOLA, Bernard La; RAOULT, Didier. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 28, n. 1. p. 237-264. Jan 2015.

LAU, Jennifer T; WHELAN Fiona J; HERATH, Isiri; LEE, Christine H; COLLINS, Stephen M; BERCIL, Premysl; SURETTE, Michael G. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. **Genome Medicine**. v.8, n.1. Jul 2016.

LI, Zhui; WANG, Weiwel; LIU, Dan; GUO, Yuming. Effects of Lactobacillus acidophilus on gut microbiota composition in broilers challenged with Clostridium perfringens. **PLOS one**. 16p. 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188634>. Acesso: 25 Fev, 2022.

MAZMANIAN, Sarkis K; LIU Cui Hau; TZIANABOS, Arthur O; KASPER, Dennis L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. v. 122, n. 1. p.107-118. Jul 2005.

MEJÍA, Daniela Buitrago; PEÑUELA, Lina Maria S; SANMIGUEL, Rosa Angélica. El gran impacto de *Clostridium perfringens* em aves de corral. **PUBVET- Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.2, n.6. 14p. Fev 2008.

MONTEIRO, Cinara R; CARMO, Monique S; MELO, Bruna O; ALVES, Matheus S; SANTOS, Camilla I; MONTEIRO, Sílvio G; BOMFIM, Maria; FERNANDES, Elizabeth; MONTEIRO-NETO, Valério. In Vitro Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of Bifidobacterium and Lactobacillus against Species of Clostridium. **Nutrients**. v.11, 2019

NAYAK, Sukanta; Probiotics and immunity: A fish perspective. **ELSEVIER**. v. 29, n. 1, p. 2 – 14. jul 2010.

OAKLEY, Brian B; LILEHOJ, Hyun S; KOGUT, Michael H; KIM, Woo K; MAURER, John J; PEDROSO, Adriana; LEE, Margie D; COLLETT, Stephen R; JOHNSOS, Timothy J; COX, Nelson A. The Chicken gastrointestinal microbiome. **Minireview**. p. 1574-6968. Out 2014.

STANLEY, Dragana; HUGHES, Robert J; MOORE, Robert J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. **Appl Microbiol Biotechnol**. p. 4301–4310. Mar, 2014.

TARRADAS, Joan; TOUS, Núria; GRACIA, Enric E; BRUFAU, Joaquim. The Control of Intestinal Inflammation: A Major Objective in the Research of Probiotic Strains as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry. **MDPI Microorganisms**. Jan, 2020.

TEO, Alex Yeow-Lim; TAN, Hai Meng. Inhibition of Clostridium perfringens by a Novel Strain of Bacillus subtilis Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n.8. fev 2005.

THURSBY, Elisabeth; JUGE, Nathalie. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**. v. 474, n. 11. p.1823-1836. Mai 2017.

WALSH, Calum J; GUINANE, Caitriona M; O'TOOLE, Paul W; COTTER Paul D. Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Letters**. v. 588, n.22. p. 4120-4130. Nov 2014.

WOSTMANN BS, LARKIN C, MORIARTY A, BRUCKNER-KARDOSS E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. **Laboratory animal science**. v. 33, n. 1, p. 46-50. 1983.