

José Victor Safadi Ferrarezi

**ADESÃO *in vitro* DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS COMO CARACTERÍSTICA
PREDITORA DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL EM TILÁPIA-DO-NILO**

Florianópolis

2018

José Victor Safadi Ferrarezi

**ADESÃO *in vitro* DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS COMO CARACTERÍSTICA
PREDITORA DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL EM TILÁPIA-DO-NILO**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Programa de graduação da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Bacharel em Engenharia de
Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Florianópolis

2018

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

Ferrarezi, José Victor Safadi

Adesão in vitro de bactérias probióticas como característica preditora de colonização intestinal em tilápia-do-nylo / José Victor Safadi Ferrarezi ; orientador, José Luiz Pedreira Mourão, 2018.

32 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Engenharia de Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Aquicultura. 2. Sanidade aquícola. 3. Microbiologia. 4. Piscicultura. I. Mourão, José Luiz Pedreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Aquicultura. III. Título.

José Victor Safadi Ferrarezi

**ADESÃO *in vitro* DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS COMO CARACTERÍSTICA
PREDITORA DE COLONIZAÇÃO INTESTINAL EM TILÁPIA-DO-NILO**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura e aprovado em sua forma final pelo Programa de Graduação em Engenharia de Aquicultura.

Florianópolis, 02 de novembro de 2018.

Prof.^a. Dr.^a. Anita Rademaker Valença,
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc.^a Scheila Anelise Pereira
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Emílio Mateus Costa Melo
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado ao meu avô Francisco José Safadi (*in memoriam*), por todos os ensinamentos e a herança da paixão pelos peixes e pela vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Luiz Antonio Ferrarezi e Patricia Safadi Ferrarezi, por me darem a oportunidade de cursar uma universidade federal e a chance de seguir o meu sonho, e à minha avó Abrisa João Safadi pelo carinho e anseio de me ver formado na universidade;

Agradeço ao meu primo Thiago de Oliva Ary e ao meu padrinho José Eduardo Ary, por acreditarem no meu potencial;

Agradeço à minha namorada Paula, por todo carinho e apoio para enfrentar as dificuldades;

Agradeço aos meus amigos da graduação Hugo Mendes de Oliveira e Matheus Berlofa Ferreira, pela parceria durante todo esse tempo que passamos juntos;

Agradeço aos amigos do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos – AQUOS/UFSC, pela ajuda e sabedoria que adquiri nestes últimos anos.

"Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta."
(Carl Sagan)

RESUMO

Objetivou-se no presente estudo avaliar a relação entre adesão *in vitro* e a capacidade de colonização *in vivo* do produto probiótico comercial, contendo as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, ao muco intestinal de tilápia-do-nylo-, bem como avaliar o desempenho zootécnico dos animais ao fim do período de suplementação. O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando o muco intestinal retirado de juvenis de tilápia-do-nylo saudáveis, cultivado *overnight* em uma microplaca de 96 poços de fundo chato e posteriormente incubado durante 1h a 30°C com o produto probiótico em diferentes concentrações de inóculo, as amostras foram diluídas serialmente em fator 1:10 e as diluições de 10^{-2} a 10^{-8} foram plaqueadas em meio de cultura. Para o ensaio *in vivo* foram utilizados 60 juvenis de tilápia-do-nylo, com peso e comprimento médio inicial de 9.81 ± 2.22 g e 8.33 ± 0.74 cm respectivamente, alojados em 6 unidades experimentais com volume útil de 70 litros cada, separados em dois grupos, um controle e outro suplementado. Os animais foram suplementados com o produto probiótico aspergido na ração na proporção de 100 mL Kg⁻¹ de ração e após o período experimental de 15 dias foi feita a análise microbiológica do trato intestinal para verificar o grau de colonização das bactérias. As duas bactérias (*B. subtilis* e *B. licheniformis*,) pertencentes ao produto probiótico aderiram de forma expressiva ao muco intestinal no ensaio *in vitro* a partir do inóculo de concentração 1×10^5 UFC mL⁻¹. Contudo, no ensaio *in vivo* não houve diferença significativa nos parâmetros de desempenho zootécnico e na quantidade de bactérias heterotróficas totais entre os grupos. Métodos moleculares de identificação de bactérias devem ser aplicados para verificar os grupos de bactérias presentes na microbiota intestinal, e a partir disso mostrar as alterações microbiológicas no trato intestinal e a colonização específica de cada cepa probiótica.

Palavras-chave: Piscicultura; Microbiologia; Probiótico, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the relationship between *in vitro* adhesion and the *in vivo* colonization capacity of a commercial probiotic product, containing *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* bacteria, to the intestinal mucosa of Nile tilapia, as well as to evaluate the zootechnical performance of the animals at the end of the supplementation period. The *in vitro* assay was performed using the intestinal mucus removed from healthy Nile tilapia juveniles, cultured overnight in a flat bottom 96-well microplate and subsequently incubated for 1 h at 30 ° C with the probiotic product at different concentrations of inoculum, the samples were serially diluted to factor 1:10 and the dilutions of 10⁻² to 10⁻⁸ were plated in culture medium. For the *in vivo* test, 60 Nile tilapia juveniles with initial weight and average length of 9.81 ± 2.22 g and 8.33 ± 0.74 cm were used, housed in 6 experimental units with a useful volume of 70L each. The animals were supplemented with the probiotic product sprinkled in the feed in the proportion of 100 mL Kg⁻¹ of feed, and after the experimental period of 15 days the microbiology of the intestinal tract was done to verify the degree of colonization of the bacteria. The two bacteria (*B. subtilis* and *B. licheniformis*), presents in the probiotic product, adhered expressively to the intestinal mucus in the *in vitro* assay from the inoculum of concentration 1x10⁵ CFU mL⁻¹. However, in the *in vivo* assay, there was no significant difference in the evaluation of the zootechnical performance and in the amount of total heterotrophic bacteria between the control and supplemented groups. Molecular methods of bacterial identification should be applied to verify the groups of bacteria present in the intestinal microbiota, and from this show the microbiological changes in the intestinal tract and the specific colonization of each probiotic strain.

Keywords: Pisciculture; Microbiology; Probiotic, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progressão das concentrações de adesão ao muco intestinal <i>in vitro</i>	23
Figura 2. Quantificação de bactérias heterotróficas totais do ensaio <i>in vivo</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de desempenho zootécnico	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SSE – Solução Salina Estéril

TSA – Agar Triptona de Soja

TGI – Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVO GERAL	18
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5	INTRODUÇÃO	18
6	MATERIAIS E MÉTODOS	20
6.1	Características do Produto.....	20
6.2	Ensaio de Adesão <i>in vitro</i>	20
6.3	Ensaio <i>in vivo</i>	21
6.4	Parâmetros Microbiológicos do ensaio <i>in vivo</i>	22
6.5	Parâmetros Zootécnicos	22
6.6	Análise Estatística	23
7	RESULTADOS	23
7.1	Ensaio de Adesão <i>in vitro</i>	23
7.2	Parâmetros Microbiológicos do ensaio <i>in vivo</i>	24
7.3	Parâmetros Zootécnicos	24
8	DISCUSSÃO	25
9	CONCLUSÃO	27
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção e o consumo de peixes têm aumentado substancialmente no mundo nos últimos anos, tendo em vista os benefícios da ingestão de carne de peixe, por possuírem grande quantidade de ácidos graxos de cadeia longa e proteína de ótima qualidade em sua composição. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2018) a produção piscícola progrediu muito a partir das últimas décadas, com uma taxa de crescimento média anual de 8.7%, fornecendo atualmente quase metade de todo o peixe consumido no mundo.

O pescado já foi a carne mais consumida depois da carne bovina, porém perdeu espaço para a carne suína e principalmente para a carne de frango, a qual sofreu uma redução dos preços no mercado devido à alta produção. Atualmente, visando atingir uma fatia maior do mercado de consumo de carnes, o beneficiamento do pescado está promovendo o desenvolvimento da atividade, visando a produção dos mais variados produtos (SARTORI e AMANCIO, 2012; KUBITZA, 2015).

A tilápia tem grande destaque na piscicultura brasileira, ganhando força a partir dos anos 1990, sendo atualmente a principal e mais produzida espécie de peixe no Brasil, superando 50% quando comparada às outras espécies, principalmente devido a sua rusticidade de criação, capacidade de resistir a condições adversas de ambiente, boa taxa de conversão alimentar e alto rendimento de filé (KUBITZA, 2003).

A boa qualidade da carne da tilápia também faz com que ela seja propícia ao mercado de exportação para países europeus e norte americanos. O valor do filé da tilápia nos Estados Unidos, pago por atacadistas, varia de 3 a 6 dólares por quilo, mostrando ser um produto que tende a ser cada vez mais valorizado pelo agronegócio brasileiro (KUBITZA, 2003).

A atratividade que a produção de peixes gerou nos últimos anos deu origem a diversos pequenos produtores familiares, conseqüentemente criou uma demanda de produção de insumos, centros de beneficiamento e desenvolvimento tecnológico para resolver as problemáticas associadas aos cultivos, como por exemplo, o surgimento de doenças em consequência do adensamento irracional dos animais (SILVA et. al, 2017).

As doenças são uma ameaça constante à rentabilidade dos cultivos, que quando presentes causam grandes surtos de mortalidade, acarretando em perdas econômicas significativas aos produtores. Tais eventos estão em grande parte associadas ao estresse dos animais, o qual gera uma depressão no sistema imunológico, causado na maioria das vezes

por manejo inadequado, variações climáticas bruscas, má qualidade de água, entre outros (YOUSEFIAN e AMIRI, 2009). Dentre as doenças que acometem comumente os animais de cultivo estão as de origem bacteriana, capazes de se espalhar rapidamente e dizimar uma produção em poucos dias. Para combater esse tipo de enfermidade são comumente usados antibióticos e outros quimioterápicos altamente agressivos. Porém o tratamento nem sempre é eficiente, são custosos e causam um grande impacto ambiental, além de selecionar cepas resistentes, tornando ainda mais difícil o combate a esse tipo de enfermidade (MOURIÑO et al., 2016).

Em contrapartida, a prevenção se torna a melhor alternativa no controle de doenças através de manejos sanitários corretos, utilização de vacinas e aditivos alimentares. O uso de aditivos alimentares promove não só maior resistência a patógenos como também tem a capacidade de melhorar o desempenho de parâmetros zootécnicos. Dentre os aditivos alimentares podemos citar imunoestimulantes, óleos essenciais, ácidos orgânicos, prebióticos e probióticos (ISHIKAWA et al., 2008; PEREIRA et al., 2016).

Cada vez mais os probióticos tem se mostrado uma ferramenta eficiente para promover a melhora da saúde e do bem-estar de organismos aquáticos. A definição científica do termo probiótico tem sido debatida há várias décadas e não existe uma definição, tal que possa abranger todos os produtos probióticos no mercado (MERRIFIELD e RINGO, 2014). Segundo Gatesoupe (1999), probióticos são células microbianas administradas de maneira que entrem no trato intestinal e mantenham-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal.

O estudo dos probióticos no organismo dos animais está focado principalmente no trato gastrointestinal, pois é o meio de introdução dos aditivos alimentares e ao mesmo tempo porta de entrada para os patógenos, logo a eficiência de um probiótico está diretamente ligada à capacidade de as bactérias presentes no produto comercial se aderirem da melhor forma possível ao muco intestinal (colonização). (MERRIFIELD e RINGO, 2014).

Diversos estudos já comprovaram a eficácia das bactérias probióticas em melhorar o sistema imunológico, funções digestivas, desempenho de crescimento, fecundidade e redução do estresse oxidativo. Porém, há um impacto significativo causado pelas bactérias probióticas na microbiota intestinal nativa, sob o aspecto quantitativo na colonização do trato gastrointestinal (TGI), e poucos estudos procuram elucidar a forma como isso acontece (CORNÉLIO, 2013; GONÇALVES, 2009).

A modulação da microbiota intestinal nativa após a aplicação de probióticos contendo bactérias gram-positivas, tais como *Bacillus* sp. e *Lactobacillus* sp., e bactérias gram-

negativas, como *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio* sp., já foi demonstrada (Gatesoup, 2007). Neste contexto, as bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente utilizadas em estudos com probióticos, pois produzem esporos resistentes a condições ambientais adversas, podendo ser liofilizadas, mantendo-se estáveis dentro da ração sem qualquer efeito deletério (NAKANDAKARE, 2013).

Outra importante característica dos *Bacillus* sp., como bactérias gram-positivas, é a sua capacidade de melhorar a qualidade da água e do solo, através da oxidação do material orgânico particulado, fazendo com que a água residual descartada seja menos carregada com material orgânico, fato atribuído também ao maior aproveitamento da ração pelos peixes (ALBUQUERQUE, 2013).

A identificação das diferentes bactérias presentes no TGI pode ser feita através de diferentes técnicas, como métodos moleculares mais complexos, os quais costumam ser mais precisos, porém demasiadamente caros e que necessitam de maior tempo. Métodos convencionais de microbiologia, como a utilização de métodos dependentes de meios de cultura, os quais possibilitam apenas a observação fenotípica, são capazes de indicar os microrganismos presentes no TGI e através disso isolar e quantificar determinados grupos (MERRIFIELD e RINGO, 2014).

Dessa forma, faz-se necessário a utilização de metodologias eficientes capazes de determinar o grau de colonização de determinado microrganismo no trato intestinal. A metodologia de ensaio de adesão *in vitro* de bactérias probióticas ao muco intestinal de peixes é um método de análise microbiológica, onde, através destes ensaios é possível prever o grau de colonização que uma bactéria consegue obter dentro do trato intestinal e sua relação com as bactérias nativas presentes no muco (SUGIMURA, HAGI e HOSHINO, 2010).

Com o intuito de gerar uma melhor compreensão sobre a metodologia de adesão *in vitro* de bactérias ao muco intestinal, este estudo traz o ensaio *in vitro* como um preditor de colonização do ensaio *in vivo*, utilizando um produto probiótico comercial e o muco intestinal retirado de tilápia-do-nilo.

2 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos são realizados com probióticos, porém apresentam resultados controversos e muitas vezes não comprovam a colonização do microrganismo na mucosa intestinal, isso ocorre pela complexidade de técnicas capazes de avaliar o grau de colonização

da cepa a mucosa intestinal. Dessa forma, o desenvolvimento de uma metodologia *in vitro* de avaliação de colonização de bactérias ao trato intestinal, sem a necessidade de um ensaio *in vivo* ou utilização de técnicas mais custosas, se faz necessário. O método de adesão *in vitro* pode constituir uma ferramenta necessária na investigação e validação de cepas candidatas à probióticos, uma vez que fornece dados preliminares sobre a forma como o microrganismo se comportará no trato intestinal dos peixes. Este método contribui com resultados que darão facilidade e rapidez para a seleção de cepas mais adequadas para ensaios *in vivo* e validação de produtos comerciais, poupando tempo, recursos e uso de animais em demasia.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a adesão ao muco intestinal de tilápia-do-nylo *in vitro* comparado à colonização *in vivo* do produto probiótico comercial PureGro®.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a capacidade de adesão *in vitro* das bactérias probióticas do produto comercial ao muco intestinal dos peixes.
- Testar a capacidade de adesão *in vivo* das bactérias probióticas do produto comercial ao muco intestinal dos peixes.
- Comparar as taxas de adesão nos ensaios *in vitro* e *in vivo* para validação do produto e da metodologia *in vitro* como análise preliminar otimizando o processo de validação de cepas e produtos probióticos.
- Avaliar o desempenho dos animais suplementados com o produto probiótico comercial PureGro® durante 15 dias.

5 INTRODUÇÃO

A intensificação dos cultivos é uma realidade cada vez mais frequente na aquicultura. O aumento das densidades de estocagem associado a um manejo inadequado, pode acarretar no aparecimento de enfermidades que fatalmente trarão prejuízos econômicos aos produtores, os quais muitas vezes acabam optando pelo uso indiscriminado de antibióticos. Esta prática pode levar ao acúmulo de resíduos no pescado e no meio-ambiente, além de contribuir para a seleção de cepas bacterianas resistentes. Neste contexto, alguns produtores têm recorrido ao uso de produtos alternativos, como: vacinas e aditivos alimentares, os quais protegem os

animais cultivados sem prejudicar o meio-ambiente e, ainda são capazes de melhorar a eficiência produtiva (OLIVEIRA et al., 2007; TAVECHIO et al., 2009).

Como aditivos alimentares, se destacam os probióticos, os quais se inseriram na produção aquícola recentemente e têm se mostrado muito eficientes, na melhora do desempenho zootécnico e nos parâmetros imunológicos dos animais, uma vez que promovem crescimento acelerado, boas taxas de conversão alimentar e maior resistência a patógenos (OUWEHAND e SALMINEN, 2003).

Segundo Gatesoupe (1999), probióticos são células microbianas administradas de maneira que entrem no trato intestinal e mantenham-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal. Sendo assim, os probióticos constituem ótima medida profilática para evitar doenças e substituir o uso de quimioterápicos. Diferentes microrganismos são utilizados como probióticos em aquicultura: bactérias ácido-láticas, bactérias esporuladas, bactérias gram negativas e leveduras (JATOBÁ et al., 2008). Entretanto, algumas destas bactérias (*Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. e *Bacillus* sp.) podem ser potencialmente patogênicas aos organismos cultivados, sendo, portanto, aconselhável a caracterização genotípica das cepas antes de sua utilização como probiótico nos cultivos (FERREIRA, 2012).

Diversos são os modos de ação pelos quais os probióticos atuam nos animais. Um deles seria a produção de compostos antimicrobianos, como: os ácidos orgânicos, que inibem o crescimento de bactérias patogênicas. Outro mecanismo de ação seria a exclusão competitiva por sítios de adesão, ou seja, a adesão de bactérias ácido láticas nas células intestinais do animal, não deixando espaço para que outros microrganismos, possivelmente patogênicos, se instalem (JATOBÁ et al., 2008).

Este último mecanismo de ação dos probióticos é muito interessante, uma vez que a relação entre adesão ao epitélio intestinal e colonização do trato intestinal é um dos fatores que determina a eficácia de uma cepa probiótica. Uma cepa que se adere mais facilmente ao muco intestinal pode colonizar melhor o intestino do que outra com menor capacidade de adesão. Desta forma, a realização de testes de adesão *in vitro* permite avaliar o grau de adesão das bactérias ao muco intestinal do animal, e ainda correlacionar estes resultados com ensaios de colonização *in vivo* (SUGIMURA; HAGI; HOSHINO, 2010).

Na seleção de cepas probióticas para espécies aquícolas, geralmente a primeira etapa a ser verificada é a capacidade de colonização das cepas ao trato intestinal, através de ensaios *in vivo*. O ineditismo deste trabalho está na utilização de uma metodologia alternativa *in vitro*, que forneça resultados preliminares capazes de reduzir a realização de ensaios de colonização

in vivo e o número de animais necessários para a realização dos mesmos, reduzindo custos, agilizando o processo e a eficiência na seleção de cepas probióticas (MOURIÑO et al., 2016).

É difícil precisar quais cepas probióticas beneficiarão determinada espécie de peixe, uma vez que a composição da microbiota intestinal varia muito de uma espécie para outra. Com hábitos alimentares distintos e composições enzimáticas específicas, criam-se microhabitats intestinais diferentes entre as espécies. Estas condições selecionarão naturalmente os microrganismos mais adaptados a sobreviverem e colonizarem o trato intestinal (MERRIFIELD e RINGO, 2014).

O foco deste estudo é avaliar um produto probiótico comercial contendo as bactérias probióticas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* através do método de adesão *in vitro* do muco intestinal de tilapia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), elucidando a relação entre adesão *in vitro* e habilidade de colonização *in vivo*. A taxa de adesão *in vitro* será utilizada como índice para verificar a viabilidade do produto probiótico quando aplicado e ofertado na ração no ensaio de colonização *in vivo*.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Características do produto probiótico comercial

O produto testado no presente estudo foi o PureGro[®], fabricado pela empresa DSM Nutritional Products Inc. com sede na Holanda, aprovado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA-Q-2015-00164) e registrado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sob o número SP-0350930374. De acordo com o fabricante o produto contém óleo mineral, casca de arroz, carbonato de cálcio e as bactérias probióticas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração mínima de $0,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ de cada bactéria.

Através da diluição do produto em solução salina estéril (SSE 0,65% NaCl), em fator 1:10, realizou-se a contagem dos esporos dos *Bacillus* sp. presentes no produto em câmara de newbauer, atestando a concentração total de 1×10^9 UFC g⁻¹.

6.2 Ensaio de Adesão *in vitro*

Para os ensaios de adesão *in vitro* foi utilizada a metodologia adaptada de SUGIMURA, HAGI e HOSHINO (2010), alterando os meios de cultura e diluições. Os peixes após serem anestesiados, foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com solução de Eugenol (75 mg L⁻¹), eviscerados e o intestino removido e lavado com SSE 0,65%.

O muco intestinal foi obtido através da raspagem delicada da superfície intestinal e ressuspendido em SSE 0,65%. A solução de muco foi diluída e utilizada a uma concentração proteica de 1,0 mg/ml. Este teste foi realizado em triplicata.

Posteriormente foram adicionados 100 µL da solução de muco em cada poço de uma microplaca fundo chato de 96 poços, a qual foi incubada *overnight* a 4°C. Em seguida, o excesso de muco foi removido lavando-se os poços duas vezes com 200 µL de SSE 0,65%. Posteriormente, foram adicionados 50 µL do produto probiótico PureGro[®] nas concentrações 10³ a 10⁸, diluído em fator 1:10 em SSE 0,65%, em seus respectivos poços e a microplaca incubada por 1 hora a 30°C. As bactérias não aderidas foram removidas por dupla lavagem dos poços com 100 µL de SSE 0,65%. Em seguida, 50 µL de SSE 0,65% foram adicionados por poço e as bactérias aderidas ao muco intestinal foram raspadas com a ponta de uma pipeta obtendo-se uma amostra única.

A amostra então foi diluída serialmente em fator 1:10 e as diluições de 10⁻² a 10⁻⁸ foram plaqueadas em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar). Para quantificar a concentração de bacilos realizou-se a contagem de bactérias heterotróficas totais e a diferenciação pela morfologia e caracterização pelo método de Gram.

6.3 Ensaio *in vivo*

O experimento foi realizado no Bioensaio do Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, localizado no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para tal, foram utilizados 60 juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) saudáveis adquiridos na piscicultura AQUASUL, localizada no município de Ilhota em Santa Catarina, com a média de 9.81 ± 2.22 g de peso e 8.33 ± 0.74 cm de comprimento, divididos homoganeamente em 6 unidades experimentais de 100 L, sendo 3 unidades destinadas ao grupo controle, animais alimentados com dieta sem a adição do produto probiótico PureGro[®], e 3 unidades ao grupo suplementado, animais alimentados com dieta comercial suplementada com o probiótico PureGro[®] durante 15 dias para observar a colonização inicial do produto. As unidades foram acopladas ao sistema de recirculação de água com filtros do tipo mecânico, esterilização UV e reatores biológicos.

Os parâmetros de qualidade da água foram controlados com análises diárias de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade usando o equipamento multiparâmetro Hanna[®] HI-9829, e amônia total e nitrito a cada 3 dias utilizando kit colorimétrico Alfakit[®]. A média dos valores foi: temperatura da água 25.67 ± 1.5°C, oxigênio dissolvido 6.58 ± 0.43 mg

L^{-1} , pH 7.50 ± 0.32 , salinidade $1.05 \pm 0.01\%$, amônia $0.50 \pm 0.01 \text{mg L}^{-1}$ e nitrito $0.15 \pm 0.02 \text{mg L}^{-1}$.

A ração utilizada no ensaio foi a Supra® com 40% de proteína em sua composição e a alimentação foi calculada segundo ZIMMERMANN (2005) a uma quantidade de 5% da biomassa ao dia, dividida em quatro porções. Para a incorporação do probiótico na ração foi utilizado o método de asperção, onde o produto foi diluído à proporção de 1:10 em SSE 0,65%, na proporção de 100mL Kg^{-1} de ração. Após a aplicação da solução na dieta, foram realizadas agitações periódicas em um becker por aproximadamente 15 minutos antes de fracionar em porções, a fim de se obter a máxima incorporação na ração.

Para averiguar a viabilidade do produto junto à ração, uma porção de 1g da ração com o probiótico PureGro® foi macerada e diluída serialmente em fator 1:10 com SSE 0,65% , e cada diluição plaqueada em meio de cultura TSA para a quantificação do número de colônias viáveis.

6.4 Parâmetros microbiológicos do ensaio *in vivo*

Ao final do período experimental, os animais permaneceram em jejum por 24 horas, e a coleta foi realizada utilizando 3 animais de cada caixa. Após eutanásia por aprofundamento anestésico foram coletadas porções do trato intestinal médio posterior dos animais para verificação do grau de colonização da bactéria probiótica em função do tempo de tratamento com o produto.

Para isso realizou-se um pool do trato intestinal dos 3 animais coletados de cada caixa para compor as amostras que em seguida foram pesadas e maceradas em gral de porcelana com SSE 0,65%. As amostras foram então diluídas serialmente em fator 1:10, e as diluições de 10^{-5} a 10^{-9} plaqueadas em meio de cultura TSA, a fim de quantificar a concentração de bactérias heterotróficas totais, e a concentração das bactérias probióticas utilizando coloração de gram .

6.5 Parâmetros Zootécnicos

No ensaio de colonização *in vivo*, foram realizadas duas biometrias, final e inicial, aferindo peso e comprimento de cada peixe individualmente. Os cálculos, para as características de desempenho, foram feitos para cada unidade experimental, utilizando as variantes: peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso (g), comprimento total inicial (cm), comprimento total final (cm), conversão alimentar, taxa de crescimento específico ($\% \text{ dia}^{-1}$) e sobrevivência, segundo as fórmulas:

Ganho de peso (g) = Peso final (g) – Peso inicial (g)

Conversão alimentar = Consumo de ração (g)/ Ganho de peso (g)

Sobrevivência (%) = N° de peixes final x 100/ N° de peixes inicial

6.6 Análise Estatística

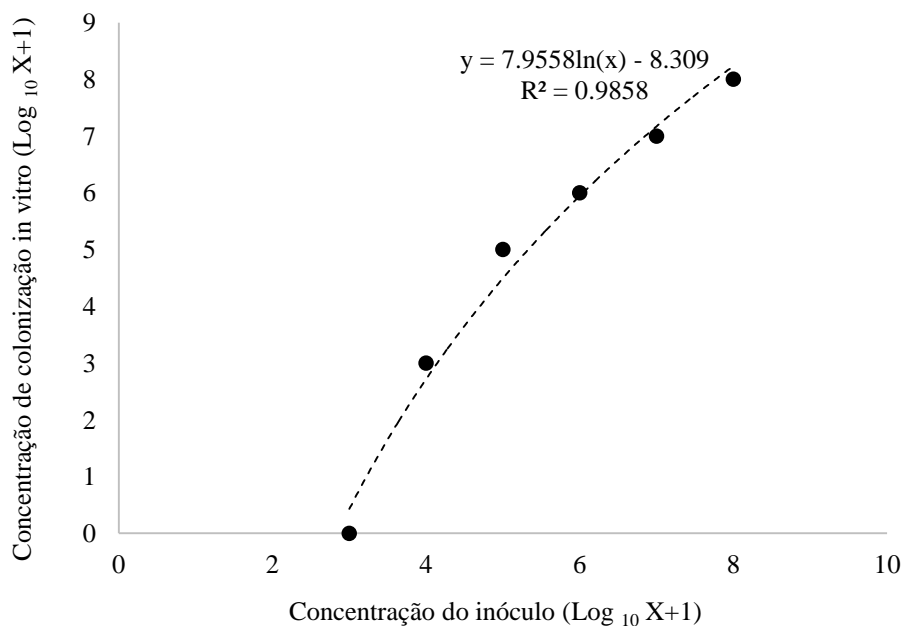
Todos os dados do ensaio *in vivo* foram submetidos ao teste T de Student com grau de significância de 5% e para os dados *in vitro* foi realizada uma análise de regressão, utilizando o software Statistic 10.

7 RESULTADOS

7.1 Ensaio de Adesão *in vitro*

A partir do ensaio de adesão *in vitro*, foi possível observar um aumento do grau de adesão com relação à concentração do inóculo (Figura 1). O inóculo de concentração 1×10^3 UFC mL⁻¹ não foi capaz de aderir ao muco, já a partir do inóculo de concentração 1×10^4 UFC mL⁻¹, a adesão foi progressiva chegando a 100%.

Figura 1. Progressão das concentrações de adesão ao muco intestinal *in vitro*, de tilápias-do-nylo, relativas à concentração do inóculo de ambas as bactérias oriundas do produto comercial PureGro[®], com valores decimais representados em Log₁₀ X+1.

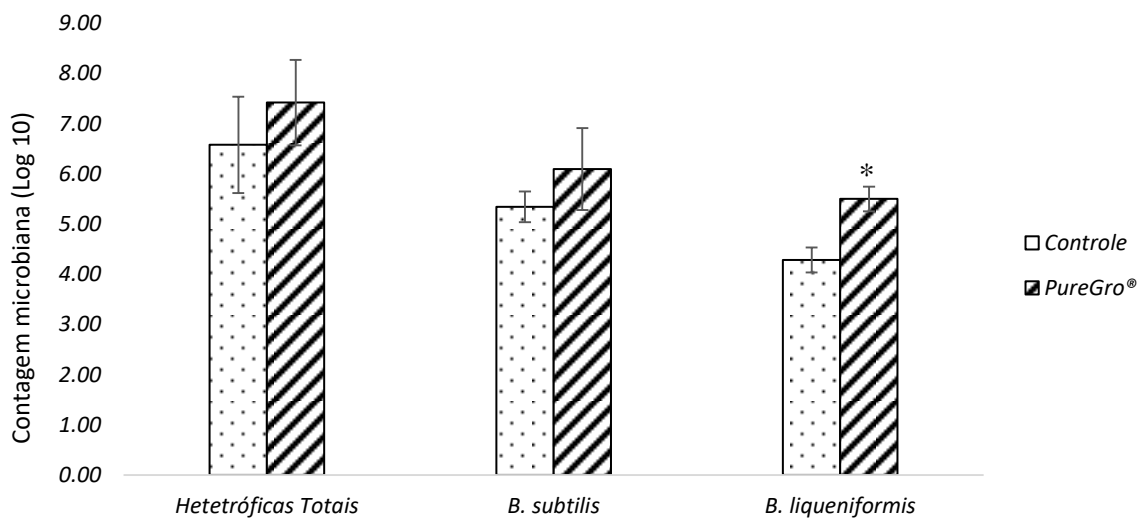


7.2 Parâmetros Microbiológicos do ensaio *in vivo*

Ambas as cepas probióticas estavam presentes na ração a uma concentração de 1×10^7 UFC mL⁻¹ no momento da alimentação.

Para a coleta dos resultados microbiológicos do ensaio *in vivo* realizou-se a contagem das bactérias heterotróficas totais e a contagem diferencial, através da identificação e caracterização por coloração de gram, a fim de verificar alteração pela suplementação com *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Figura 2). Houve diferença significativa apenas na contagem de *Bacillus licheniformis*, porém esta diferenciação não pode ser confirmada através da metodologia de contagem de colônias em placas de agar nutriente, sendo indispensável o uso de métodos de identificação molecular.

Figura 2. Quantificação de bactérias heterotróficas totais presentes no trato intestinal de tilápias-do-nylo suplementadas ou não com produto comercial PureGro[®], durante 15 dias, com valores decimais de UFC g⁻¹ representados em Log₁₀.



7.3 Parâmetros Zootécnicos

Não houve diferenças estatísticas significativas nos parâmetros de desempenho zootécnico entre os grupos controle e suplementado (tabela 1).

Tabela 1. Dados de desempenho zootécnico de tilápias-do-nylo suplementadas ou não com PureGro[®], durante 15 dias.

Variável	PureGro®	Controle	Valor de p
Peso inicial (g)	9,52 ± 2,20	10,10 ± 2,24	0,92
Comprimento inicial (cm)	8,21 ± 0,73	8,45 ± 0,75	0,92
Peso final (g)	20,08 ± 6,62	20,50 ± 6,40	0,85
Comprimento final (cm)	10,25 ± 2,28	10,20 ± 2,12	0,69
Ganho de peso (g)	11,19 ± 4,45	11,14 ± 4,75	0,75
Conversão alimentar	0,82 ± 0,50	0,84 ± 0,59	0,47
Sobrevivência (%)	83,3 ± 2,08	93,3 ± 0,58	0,46

8 DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio *in vitro* mostram que a concentração do inóculo é diretamente proporcional ao grau de adesão alcançada pelas bactérias probióticas no muco intestinal. A partir do inóculo de concentração 1×10^5 UFC mL⁻¹ foi possível obter um maior percentual de adesão, uma explicação plausível está na relação de *quorum sensing* entre as bactérias probióticas para a formação do biofilme, que ocorre a partir do aumento progressivo da quantidade da bactéria no interior do trato intestinal (PARSEK e GREENBERG, 2005).

O ensaio *in vitro* alcançou níveis próximos a 100% de adesão das bactérias ao muco intestinal referente ao inóculo aplicado. É inteligível analisarmos esse resultado como superestimado, visto que Sugimura, Hagi e Hoshino (2010) observaram que bactérias acidoláticas foram capazes de aderir até 20% em ensaios *in vitro* utilizando muco intestinal de carpa, porém mostra que a espécie de peixe da qual o muco foi retirado para o ensaio pode influenciar diretamente na taxa de adesão do ensaio *in vitro*, bem como o tipo de bactéria a ser testada, colocando em foco a necessidade de realizar mais ensaios com diferentes espécies de peixes e cepas probióticas, a fim elucidar melhor essas questões.

Houve diferença significativa apenas na concentração da bactéria *Bacillus licheniformis*, entre o grupo tratado e o grupo controle. Mello et al., (2013) e Tachibana et al., (2011) mostraram que ao suplementar alevinos de tilápia com *Bacillus subtilis* durante pelo menos 30 dias houve colonização expressiva, o que pode indicar que esta bactéria necessita de um período maior que 15 dias para colonizar de forma efetiva o trato intestinal, porém nestes estudos usou-se a contagem diferencial de colônias em meio TSA para quantificar a colonização por *Bacillus* sp. no TGI, método não utilizado para realizar este tipo de afirmação, pois não possui o grau de certeza suficiente para a identificação da espécie da bactéria a ser quantificada.

Há uma grande dificuldade em quantificar e diferenciar corretamente bactérias do gênero *Bacillus*, pois não existem meios de cultura seletivos para este grupo de bactérias o que implica diretamente na necessidade da realização de métodos moleculares mais avançados, através destes métodos é possível consolidar os argumentos que indicam a eficácia de colonização dos *Bacillus*.

Na comparação entre os resultados de colonização *in vivo* e adesão *in vitro* é possível observar que a concentração de bactérias totais no grupo suplementado ficou a um nível muito próximo do indicado no ensaio de adesão *in vitro*, mesmo sendo pressuposto de que nem todas as bactérias presentes na contagem sejam do grupo *Bacillus* sp. e possam estar presentes em menor quantidade, deve ser levado em conta também o fato de que as condições *in vitro* são mais favoráveis ao crescimento das bactérias do que no ambiente natural, menos controlado e com maiores variáveis. O prenúncio do ensaio *in vitro* de que as bactérias oferecem alto grau de colonização só será confirmado a partir da identificação molecular da fração de cada grupo de bactérias presentes no TGI.

Sugimura, Hagi e Hoshino (2010) testaram diferentes cepas probióticas autóctones na mesma relação de adesão *in vitro* e colonização *in vivo* utilizando muco intestinal de carpa, e obtiveram resultados positivos da relação entre os dois ensaios. Ainda não foram realizados ensaios de adesão *in vitro* utilizando cepas alóctones em peixes, o que mostra a necessidade da realização de mais ensaios. Ouwehand e Salminen (2003) ainda destacam que considerando todos os fatores que influenciam a adesão *in vivo* e que não podem ser simulados *in vitro*, a validade dos resultados dos ensaios de adesão *in vitro* permanece extremamente incerta, portanto não descartando a necessidade da realização do ensaio *in vivo* para a validação da eficiência de cepas probióticas.

De acordo com os resultados de desempenho zootécnico, os 15 dias de suplementação com o probiótico não foram suficientes para gerar melhoras significativas no ganho de peso e conversão alimentar, o que corrobora com os dados de Tachibana et al., (2011) e Azevedo et al., (2016), os quais suplementaram *Bacillus subtilis* na dieta de tilápia-do-nilo, durante 30 e 70 dias respectivamente, não encontrando diferenças nas taxas de crescimento. No entanto, os efeitos sobre a melhoria do desempenho zootécnico em animais suplementados com probióticos, deve-se às características da bactéria probiótica em produzir uma boa quantidade de enzimas digestivas e se aderir tempo suficiente para trazer melhorias no intestino, melhorando a digestibilidade e a absorção de nutrientes. Bem como ao tempo de suplementação ao qual os animais são submetidos, indicando que as bactérias probióticas devem resistir às adversidades do meio gastrointestinal geradas pela competição com a

microbiota autóctone já estabelecida, sais bilares, pH e sistema imune, a fim de se aderir ao trato intestinal, colonizando-o, antes de gerar efeitos significativos na saúde do animal (MERRIFIELD e RINGO, 2014).

Há também a influência do gênero das bactérias presentes no produto, destacando-se as ácido-láticas e leveduras, Cornélio et al., (2013) observaram que ao suplementar alevinos de tilápia com *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* durante 55 dias, foi possível obter melhoras significativas no ganho de peso, conversão alimentar e taxas de retenção proteica e energética.

9 CONCLUSÃO

Não foi possível relacionar a adesão do probiótico *in vitro* do muco intestinal e colonização *in vivo* do trato intestinal, concluindo que para tal são necessários testes moleculares mais avançados, porém os resultados obtidos mostram fortes indícios do ensaio *in vitro* poder servir como preditor da eficiência de uma potencial cepa probiótica.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, Daniele Menezes et al. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, 2013.

AZEVEDO, Rafael Vieira de et al. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 9-16, 2016.

CORNÉLIO, Fernando Henrique Gomes et al. Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 863-870, 2013.

FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Fisheries Department. **The state of world fisheries and aquaculture**. Meeting the sustainable development goals. Rome. 2018.

FERREIRA, Antônio Hosmylton Carvalho et al. Uso De Probióticos Na Aquicultura – Revisão. **Nutritime**, Teresina, v. 10, n. 05, p.1965-1980, set. 2012. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/Nutritime%20-%20artigo%20176_.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2018.

GATESOUBE, F.j.. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. **Aquaculture**, [s.l.], v. 267, n. 1-4, p.20-30, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005>.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GONÇALVES, Adriano. Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina. 2009. viii, 65 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100240>>.

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J.; LOMBARDI, J. V. Total leukocyte counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Sciences**, v. 13, p. 54-63, 2008.

JATOBÁ, Adolfo et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p.1201-1207, set. 2008.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v.150, p.10-23, 2015.

KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da aquicultura**, v. 13, n. 76, p. 25-35, 2003.

MERRIFIELD, Daniel; RINGO, Einar. **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**. Chichester: John Wiley e Sons, Ltd, 2014. 498 p.

MELLO, Hurzana de et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 724-730, 2013.

MOURIÑO, José Luiz Pedreira et al. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum*×*Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae). **Aquaculture Reports**, [s.l.], v. 3, p.166-171, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.001>.

NAKANDAKARE, Ivan Bernardoni et al. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, p. 121-135, 2013.

OLIVEIRA, E. G. et al. Produção de tilápia: mercado, espécie, biologia e recria. **Embrapa Meio-Norte-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

OUWEHAND, Arthur C.; SALMINEN, Seppo. In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. **Microbial Ecology In Health And Disease**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.175-184, dez. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08910600310019886>.

PARSEK, Matthew R.; GREENBERG, E.p.. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.27-33, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>.

PEREIRA, Gabriella do Vale et al. Probiotic supplementation in diet and vaccination of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *P. corruscans*♂). **Ciência Rural**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.348-353, fev. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150543>.

SARTORI, Alan Giovanini de Oliveira; AMANCIO, Rodrigo Dantas. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

SILVA, Bruno Corrêa da et al. Desempenho produtivo da piscicultura catarinense. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, p.15-18, jan. 2017. Quadrimestral.

SUGIMURA, Yuya; HAGI, Tatsuro; HOSHINO, Takayuki. Correlation between in Vitro Mucus Adhesion and the in Vivo Colonization Ability of Lactic Acid Bacteria: Screening of New Candidate Carp Probiotics. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**. Tsukuba, p. 511-515. 29 out. 2010.

TACHIBANA, Leonardo et al. Probiótico na alimentação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), durante a inversão sexual: desempenho zootécnico e recuperação da bactéria probiótica intestinal. **Bioikos**, v. 25, n. 1, 2012.

TAVECHIO, Washington Luiz Gomes; GUIDELLI, Gislaine; PORTZ, Leandro. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **B. Inst. Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-41, 2009.

YOUSEFIAN, M; AMIRI, M.S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African Journal of Biotechnology**. v.8, n.25, p.7313-7318, 2009.

ZIMMERMANN, S. Programa de alimentação de tilápias em viveiros sistema semi-intensivo (2-3/m²). [s.d.]. Disponível em: <http://www.aquabel.com.br/racao.asp>. Acesso em: 13 mar. 2005.