

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA A TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*

Gustavo Siromaru OSTI^{1,2}, Mariene Miyoko NATORI¹, Pamela GARBIM^{1,2}, Carlos Massatoshi ISHIKAWA¹, Leonardo TACHIBANA¹, Danielle de Carla DIAS¹

¹Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP

²Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, SP gustavosiromaru@hotmail.com

Apoio Financeiro: FAPESP n° processo 2014/01539-0 e n° processo 2016/00255-7

Palavras-chave: microrganismos; pH; sais biliares; teste resistência

INTRODUÇÃO

Os probióticos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (Sanders, 1998) (Castro, 2003). O conceito de probiótico tem mudado através do tempo. Para (Fuller, 1989), são suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, por meio do equilíbrio da microbiota intestinal. Para a seleção de bactérias com potencial probiótico, deverá ser avaliado inicialmente a resistência destas frente às condições do trato intestinal dos peixes como o pH baixo e a ação de sais biliares (Merrifield, 2010). Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar as bactérias quanto sua resistência ao pH e ação dos sais biliares em amostras coletadas em pisciculturas de diferentes regiões as quais produzem a espécie tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

MATERIAL E MÉTODOS

As bactérias foram selecionadas de tilápias provenientes de 10 pisciculturas comerciais em três regiões do Brasil (nordeste, sudeste e sul), para aumentar a variabilidade de espécies de bactérias e, aumentar as chances de selecionarmos uma bactéria com características probióticas. Foram utilizados 10 peixes por piscicultura com peso médio de 30g, para a coleta do muco da pele e do intestino. As coletas foram realizadas no verão, período em que mais se manifestam as patologias em tilápias.

Os testes de resistência ao pH e aos sais biliares foram realizados de acordo com as metodologias descritas por (PERELMUTER, 2008) com modificações. Para os testes de resistência ao pH e aos sais biliares, foram utilizados microtubos de 2,0 mL com 900 µl de meio de cultura TSB com pH 2, 3 e 4 e sais biliares às concentrações de 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 %. Os meios de cultivo foram filtrados com filtros de seringa de 0,22 micras com a finalidade de esterilização. Após a preparação dos meios, semeou-se as bactérias coletadas em intestino

e muco de peixe em caldo TSB e incubados por 24 horas em estufa B.O.D a temperatura de 28 °C. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas até 10^{-6} em meio líquido separadamente. As amostras contidas em microtubos foram colocadas em estufa B.O.D a temperatura de 23°C e permaneceram por tempo total de três horas, sendo retiradas a cada uma hora em alíquotas de 10 uL de cada diluição e colocadas em placa de Petri, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa B.O.D por 24 horas em temperatura de 28°C. Foram realizadas as contagens de colônias visualmente com o uso de uma lupa de aumento (Figura 1). As amostras que não passaram no teste de resistência ao pH, não foram avaliadas quanto a sua resistência aos sais biliares. As bactérias que não cresceram em placas foram consideradas como inaptas para prosseguir os testes de seleção.

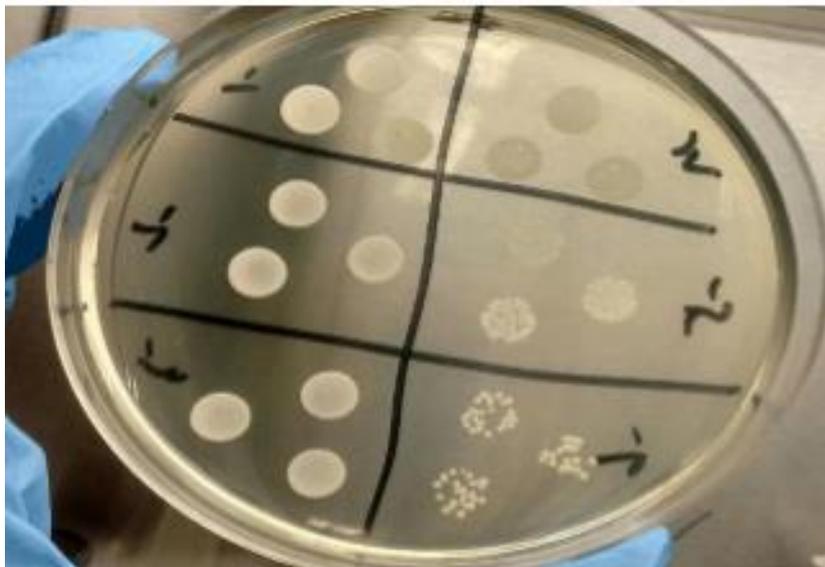


Figura. 1. Contagem de colônias de bactérias do teste de pH em 10^{-6} (20) UFC.

As contagens para determinação de quantidade de colônias foram feitas pela fórmula: $UFC = \text{média do número de colônias de bactérias} * \text{diluição correspondente} / \text{volume em mL}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias testadas foram consideradas aptas quando houve crescimento após exposição aos meios de cultura com pH modificado e acrescidos de sais biliares, segundo (Perelmuter, 2008). e posterior semeadura em placa de petri e incubação de 24 horas.

Os testes de resistência ao pH foram feitos primeiramente por ter sido identificado maior fator de seletividade, promovendo otimização no uso dos materiais. Foram alteradas as quantidades de meio de cultura TSB de 900uL para 450uL tanto nos testes de pH quanto

nos testes de sais biliares com a finalidade de redução das contaminações por contato externo e otimização de materiais e foram mantidas as diluições na proporção de 1/10.

De um banco de amostras de 1402 amostras, 77 amostras foram testadas e analisadas, sendo que 22 foram aprovadas nos testes de resistência ao pH e aos sais biliares e encaminhadas para a sequência de testes de inibição de bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- CASTRO, J.C. 2003 Uso de aditivos e probióticos em rações animais. In: Ferreira, C.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Teixeira, P.C., França, F.M., Dias, D.C. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34: 12-18.
- FULLER, R. 1989 Probiotics in man and animals. *Journal Applied Bacteriology*, 66: 365- 378.
- MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S.J.; BAKER, R.T.M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. 2010 The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. 302 (1-2): 1-18.
- PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. 2008 *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1718-1725.
- SANDERS, M.E. 1998 Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8: 341-347.
- SILVA, J.R.M.C., STAINES, N.A., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., PORTO-NETO, L.R., BORGES J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal Fish Biology*, 60: 466-478