

## CAPACIDADE INIBITÓRIA DE PROBIÓTICOS COMERCIAIS *in vitro* CONTRA *Streptococcus agalactiae*\*

Mateus Cardoso GUIMARÃES<sup>1,2</sup>, Mariene Miyoko NATORI<sup>1</sup>, Luciana Yuri SATO<sup>1</sup>, Camila Aya Tanaka KATO<sup>1</sup>, Gabriel Bueno da SILVA<sup>1</sup>, Sabrina França LOPES<sup>1</sup>, Danielle de Carla DIAS<sup>1</sup>, Leonardo TACHIBANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesca - APTA - SAA, SP

<sup>2</sup>Endereço/Address: Av. Francisco Matarazzo, 455 - Água Branca, São Paulo - SP. e-mail: cardosomateus1996@gmail.com.

\* Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2017/03738-1

**Palavras chave:** Inibição, patógeno, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*.

### INTRODUÇÃO

A *Streptococcus agalactiae* é considerada a bactéria patogênica de maior ocorrência e importância econômica para piscicultura intensiva. A capacidade antimicrobiana é considerada um critério importante para seleção de probióticos. Portanto, objetivou-se selecionar um probiótico comercial capaz de inibir a bactéria patogênica *S. agalactiae*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados seis probióticos comerciais: A (*Bacillus subtilis*), B (*Lactobacillus plantarium* e *Bacillus subtilis*), C (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium Bifdo*), D (*Pediococcus acidilactici*), E (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*) e F (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*).

As análises de inibição do patógeno foram realizadas conforme a metodologia de GRAM *et al.* (1999), modificado por VIERA *et al.* (2003). As bactérias probióticas foram cultivadas em tubos com meio líquido específico para cada espécie e mantidos em estufa de BOD a 31°C. Após 24 h, estas foram incubadas por 48 h em meio sólido específico, contendo 0,75% de ágar. Em seguida, discos de 8,0 mm de diâmetro, contendo as colônias probióticas, foram confeccionados e imediatamente transferidos para placas de Petri com BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO) ágar, previamente semeadas com 100 µL de meio líquido BHI com *S. agalactiae*. As placas foram incubadas em estufa BOD a 31°C por 24 h e, após este período, foi procedida a medição das zonas de inibição (raio, mm), formadas ao redor dos discos.

A propriedade antimicrobiana de produtos extracelulares dos probióticos (PEPs) foi avaliada, seguindo a metodologia de ALIGIANNIS *et al.* (2001) modificada. Os probióticos foram cultivados em tubos de 15 ml contendo 10 ml de meio líquido específico e incubados a 31°C por 24 h e, após este período, centrifugados e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,45 µm. Foram obtidos 5 ml de solução contendo os PEPs. Os discos de papel foram embebidos com 20 µl de PEPs e transferidos para a região central das placas de Petri com BHI Ágar, previamente semeadas com 100 µL de BHI líquido com *S. agalactiae*. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa BOD a 31°C por 24 h e se procedeu a mensuração do raio (mm) das zonas de inibição formadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias probióticas *L. plantarum* e *E. faecium* foram as únicas que apresentaram halo de inibição, com os valores de 24,9±0,89 mm e 20,1±1,32 mm de raio, respectivamente. No entanto, nenhum dos probióticos comerciais testados conseguiu produzir produtos extracelulares probióticos (PEPs) capazes de inibir o crescimento da bactéria patogênica *S. agalactiae*.

A atividade antimicrobiana apresentada por *L. plantarum* (bactéria ácido-lática) contra a *S. agalactiae* também foi verificada por MEIDONG *et al.* (2017), por meio de ensaio de difusão de disco de ágar, e observaram a formação de 14,50 mm de halo de inibição. A capacidade inibitória de *L. plantarum* pode estar correlacionada à produção de compostos voláteis (e.g. peróxido de hidrogênio) e compostos intracelulares (e.g. peptídeos), a alteração de metabolismo da bactéria patogênica pela produção de enzimas e por competição de nutrientes, uma vez que não foi observada a alguma atividade antimicrobiana do extrato extracelular (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

No caso do *E. faecium*, as cepas coletadas em diversas espécies de peixes, produto e pescado demonstraram baixa capacidade inibitória para a *S. agalactiae*, com formação de halos de 3 a 5 mm, inferior ao presente estudo (MUÑOZ-ATIENZA *et al.*, 2013). Ao avaliar 522 amostras de bactérias coletadas em exemplares de pacus cultivados (*Piaractus mesopotamicus*), GUIDOLI *et al.* (2015) detectaram, por meio de testes *in vitro*, as características probióticas em oito isolados e, dentre estes, quatro eram cepas de *E. faecium*, as quais apresentaram atividade inibitória em dois patógenos, produção de peróxido de hidrogênio e alta capacidade de hidrofobicidade e de auto agregação.

## CONCLUSÃO

Portanto, os probióticos B (*Lactobacillus plantarium* e *Bacillus subtilis*) e C (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium Bifdo*) foram capazes de inibir a bactéria patogênica *S. agalactiae*.

## REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. 2001 Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9): 4168–4170.
- GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T. 1999 Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 969-973.
- GUIDOLI, M. G.; SANTINÓN, J. J.; PASTERIS, S. E. 2015 Isolation and Selection of Potentially Beneficial Autochthonous Bacteria for *Piaractus mesopotamicus* Aquaculture Activities. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(9).
- LIU, H.; WANG, S.; CAI, Y.; GUO, X.; CAO, Z.; ZHANG, Y.; LIU, S.; YUAN, W.; ZHU, W.; ZHENG, Y.; XIE, Z.; GUO, W.; ZHOU, Y. 2017 Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 60: 326–333.
- MEIDONG, R.; DOOLGINDACHBAPORN, S.; SAKAI, K.; TONGPIM, S. 2017 Isolation and selection of lactic acid bacteria from Thai indigenous fermented foods for use as probiotics in tilapia fish *Oreochromis niloticus*. *AAFL Bioflux*, 10(2): 455–463.
- MUÑOZ-ATIENZA, E.; GÓMEZ-SALA, B.; ARAÚJO, C.; CAMPANERO, C.; CAMPO, R.; HERNÁNDEZ, P. E.; HERRANZ, C.; CINTAS, L. M. 2013 Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, 13(1): 15.
- VIEIRA, F. D. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, E. A.; SOARES, M.; SILVA, B. C. D.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L.; VINATEA, L. A. 2015 In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8): 998-1004.