

## CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DA MICROBIOTA DE FRANGOS: CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA NO TRATO GASTROINTESTINAL

Moisés Sena Pessoa<sup>1</sup>, Flávia Oliveira Abrão Pessoa<sup>2\*</sup>, Paulo Ricardo de Sá da Costa Leite<sup>2</sup>, Emmanuel Arnhold<sup>1</sup>, Jéssica da Silva Mendes<sup>2</sup>, Thiago Dias Silva<sup>2</sup>, Vilson Matias Pinto<sup>2</sup>, Luis Henrique Curcino Batista<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia; <sup>2</sup> IF Goiano, Campus Ceres. \*autor correspondente: flavia.abrao@ifgoiano.edu.br.

**RESUMO:** Objetivou-se caracterizar a tolerância de isolados fúngicos provenientes do intestino delgado e grosso de frangos de corte frente aos sais biliares e ao pH digestivo. Doze aves adultas foram sacrificadas e amostras de conteúdo intestinal foram obtidas para o isolamento microbiano. Posteriormente, 10 fungos foram avaliados quanto a resistência a sais biliares quando cultivados em meio de cultura na concentração 0,3%. O crescimento das colônias frente aos sais biliares foi observado visualmente quanto à emissão do micélio. Concomitantemente determinou-se a capacidade de sobrevivência dos isolados em Caldo Sabouraud simulando faixas de pH do trato digestivo das aves. Os pH's foram ajustados para 3,0; 5,0 e 7,2 com adição de HCl. O isolado fúngico que se apresentou superior nos ensaios de potencialidade probiótica foi avaliado quanto a viabilidade em solução estoque ambiente por até seis meses. Todos os isolados testados foram resistentes a concentração de 300 mg de sais biliares, apresentando escore +++. Observou-se que em pH baixo os fungos mais tolerantes foram pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Observou-se maior desenvolvimento micelial em pH 5 para os fungos *Rhizomucor* spp. e cinco isolados de *Aspergillus* spp.. O fungo que se destacou frente aos testes foi do gênero *Rhizomucor* spp.. A solução de esporos mostrou-se viável por até 6 meses. Conclui-se que 50% dos fungos apresentaram potencial probiótico, contudo mais estudos fazem-se necessários para real indicação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aditivo microbiano, avicultura, micotoxinas, sais biliares.

**ABSTRACT:** The aim was to tolerate the loss of taste of the small and large intestine of broiler chickens to bile salts and digestive pH. The twelve adult birds were sacrificed and the intestine samples were detached for microbial isolation. Subsequently, 10 fungi were initialized for resistance to fruits when grown in 0.3% culture medium. The growth of the colonies against bile salts was observed and banned for the emission of the mycelium. Concurrently, a Sabouraud broth survival capacity was determined by simulating pH ranges of the digestive tract of birds. The pH was adjusted to 3.0; 5.0 and 7.2 with addition of HCl. What was superior in the probiotic potential assays was an assessment of the viability of the solution during the six-month period. All experimental tests were resistant to a concentration of 300 mg of bile salts, reaching +++ score. Observations that are lower in more tolerant fungi belong to the genus *Aspergillus*. Greater mycelial development at pH 5 was observed for the fungi *Rhizomucor* spp. and five isolates of *Aspergillus* spp.. The spore solution was developed in front of the testes of *Rhizomucor* spp.. Advanced standardized spore solution is feasible for up to 6 months. It concludes that 50% of the fungi suffered probiotic potential, were more studies carried out for real indication.

**KEYWORDS:** Bile salts, microbial additive, mycotoxins, poultry.

**Apoio:** FAPEG.

### INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal de frangos abriga uma microbiota diversificada, que auxilia na quebra e digestão dos alimentos (Wei et al., 2013). No entanto, a maior parte da microbiota do trato gastrointestinal permanece largamente inexplorada, tornando-se uma importante fonte de potencial biológico a ser pesquisado em termos de identificação de novas espécies, atividades enzimáticas codificadas e cepas microbianas com potencial probiótico (Stanley et al., 2014).

Alterações na microbiota autóctone (própria/natural) das aves podem levar a um desequilíbrio, com multiplicação de microrganismos patogênicos (Andreatti Filho, 2007). Foi evidenciado que os probióticos têm um bom impacto no desempenho e equilíbrio da microbiota intestinal das aves (Mountzouris et al., 2007), bem como sintetizam vitaminas, estabilizam o pH e podem liberar bacteriocinas, além de melhorarem o consumo de ração em poedeiras e frangos de corte (Rolfe, 2000).

A utilização de microrganismos como probióticos é uma alternativa ao uso de antibióticos sub-terapêuticos na cadeia de produção. Segundo Alkhalif et al. (2010), a vantagem mais importante de um probiótico é que ele não deixa nenhum resíduo na carcaça do animal e nem promove resistência microbiana. Dessa forma, objetivou-se com o presente trabalho caracterizar o potencial probiótico de isolados fúngicos provenientes do intestino de frangos de corte em função da tolerância a sais biliares e faixas de pH digestivas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFG, e aprovados sob registro 077/16. Os fungos avaliados foram selecionados em ensaio preliminar a partir de conteúdo intestinal de frangos Cobb 500 com 42 dias de idade recebendo dieta basal.

Para verificação da resistência a sais biliares, inoculou-se 100µL dos inóculos padronizados fúngicos (concentração 10<sup>11</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) em placas contendo ágar Sabouraud acrescido de 0,3% de sais biliares (Eficácia®, Brasil). Após incubação a 37°C durante 48h, o crescimento das colônias frente aos sais biliares foi observado visualmente e atribuídos escores quanto à emissão do micélio (-, +, ++ e +++). Os procedimentos foram realizados em triplicata.

Concomitantemente, preparou-se caldo Sabouraud e o pH do meio foi ajustado para 3,0; 5,0 e 7,2 com adição de ácido clorídrico estéril PA. Os dez isolados fúngicos obtidos foram inoculados em proporção de 5% para cada meio contendo o pH avaliado e incubados a 37°C. O crescimento fúngico foi avaliado após 24, 48 e 72 horas de incubação. Definiu-se o padrão “+++” (desenvolvimento máximo) representando o crescimento no controle com pH 7, sem adição de ácido. E “++”, “+”, “-“ para moderado, baixo e nulo, respectivamente (Abrão et al., 2014).

A solução padronizada do isolado fúngico que se apresentou superior nos ensaios de potencialidade probiótica, foi avaliada quanto a “validade” em estoque sob condições ambiente. Mensalmente, uma alíquota da solução produzida um mL foi plaqueada (Spread plate) em meio Ágar Sabouraud, para confirmação de viabilidade. Esse procedimento foi repetido durante seis meses.

Para o ensaio de tolerância ao pH e ácido clorídrico, após tabulação dos dados, os escores categorizados obtidos foram convertidos a números (3, 2, 1 e 0) e avaliados o efeito dos fatores: 10 fungos x 3 pH's x 3 Tempos, por meio do teste não paramétrico de Kruskall Wallis a 5% de significância. Todos os procedimentos estatísticos foram aplicados em software Assistat 7.7 Beta.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados testados foram resistentes a concentração de 300 miligramas (mg) de sais biliares em condições in vitro, apresentando escore três (+++) para todas as placas de cultivo.

Em um estudo realizado por Sugiharto et al. (2015), que avaliaram as propriedades probióticas, a atividade antioxidante e a capacidade fermentativa de *Acremonium charticola* e *Rhizopus oryzae* isoladas da mandioca seca fermentada, com aplicação particular em aves poedeiras, foi observado que os fungos testados foram tolerantes aos sais biliares nas concentrações testadas (0%, 0,2%, 0,4% e 0,8%).

Observou-se que em pH mais baixo (pH=3) os fungos mais tolerantes foram todos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, sendo os isolados (cepas) que apresentaram maior desenvolvimento micelial: *Aspergillus* IG, *Aspergillus flavus* ID e *Aspergillus* ID3. Essa situação muda ao verificar o efeito dos fungos dentro da faixa intermediária de pH. Apesar de todos os fungos terem desenvolvidos no meio, observou-se maior desenvolvimento micelial em pH 5 para os fungos: *Rhizomucor* spp. e outros cinco isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Ao verificar a faixa mais neutra de pH (pH=7,2), observa-se o fungo menos tolerante foi o *Tricophyton* spp. IG (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias de escores do desenvolvimento micelial de diferentes fungos da microbiota intestinal de frangos da linhagem Cobb 500 em relação a três pH's distintos

Fungos	pH		
	3,0	5,0	7,2
<i>Aspergillus terreus</i> IG	0,00 Bb	1,83 Ca	2,33 Ba
<i>Aspergillus</i> spp. IG	1,00 Ab	2,00 Ba	2,17 Ba
<i>Rhizomucor</i> spp. ID	0,30 Bb	3,00 Aa	2,83 Aa
<i>Aspergillus</i> spp. ID1	0,50 Bb	2,33 Ba	2,67 Aa
<i>Aspergillus flavus</i> ID	1,00 Ab	2,83 Aa	3,00 Aa
<i>Tricophyton</i> spp. IG	0,33 Bb	1,50 Ca	1,33 Ca
<i>Aspergillus</i> spp. ID2	0,00 Bb	2,83 Aa	3,00 Aa

<i>Aspergillus</i> spp. ID3	1,00 Ab	2,67 Aa	2,33 Ba
<i>Aspergillus fumigatus</i> IG1	0,00 Bb	3,00 Aa	3,00 Aa
<i>Aspergillus fumigatus</i> ID	0,00 Bb	3,00 Aa	3,00 Aa

Nota: Letras maiúsculas distintas na coluna, e minúsculas na linha, indicam diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal Wallis. Coeficiente de variação (CV%) foi de 24,27%.

Uma característica desejável é que o probiótico se desenvolva nas diferentes faixas de pH no menor tempo possível. Quando se compara “fungo x tempo de incubação” nota-se que no último tempo os fungos equalizam desenvolvimento, evidenciando tolerância dos isolados com 72 horas de incubação.

O fungo *Rhizomucor* spp. destacou-se em todos os tempos de incubação ( $P>0,05$ ), ou seja esse é um fungo processivo desde 24 até 72 horas de incubação. Resultado semelhante foi encontrado para os fungos *Aspergillus flavus* ID, *Aspergillus* spp. ID2, *Aspergillus fumigatus* IG1 e *Aspergillus fumigatus* ID, não sendo observada diferença entre os tempos de incubação ( $P>0,05$ ).

No trato digestivo das aves, sabe-se que o menor pH é encontrado no estômago (proventrículo e moela) variando de 2,4 a 5. Portanto, é de suma importância que um microrganismo a ser utilizado como aditivo microbiano seja tolerante a faixas de pH mais baixas como a demonstrada na pesquisa (Berdechini, 2012). A solução padronizada de esporos, mostrou-se viável por pelo menos seis meses em temperatura ambiente. Essa forma de preparo torna-se viável por ser prática, barata e duradoura. Contudo, futuros estudos devem ser feitos testando outras formas de inoculação, como em pó ou liofilizado, visando atender a praticidade do campo e tecnologias de inovação das indústrias de aditivos microbianos.

### CONCLUSÕES

Conclui-se que aproximadamente 50% dos fungos apresentaram potencial probiótico, contudo mais estudos fazem-se necessários para real indicação.

### AGRADECIMENTOS (OPCIONAL)

Ao Instituto Federal Goiano (IF Goiano). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

### LITERATURA CITADA

- ABRÃO, F.O.; DUARTE, E.R.; FREITAS, C.E.; VIEIRA, E.A.; GERASEEV, L.C.; DA SILVA-HUGHES, A.F.; ROSA, C.A.; RODRIGUES, N.M. **Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures**. Current Microbiology, v.69, n. 2, p.1-13, 2014.
- ALKHALF, A.; ALHAJ, M.; AL-HOMIDAN, I. **Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens**. Saudi Journal Biological Science, v. 17, p.219-225, 2010.
- ANDREATTI FILHO, R.L. **Alimentos funcionais na produção avícola**. IN: Andreatti filho RL. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Ed. Rocca Ltda; p.41-51, 2007.
- BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Ed. UFLA, p. 373, 2012.
- MOUNTZOURIS, K.C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. **Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities**. Poultry Science, v.86, p.309-317, 2007.
- ROLFE, R.D. **The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health**. Journal of Nutrient, v.130, p.3965-4025, 2000.
- WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. **Bacterial censos of poultry intestinal microbiome**. Poultry Science, v.92, p.671-683. 2013.
- STANLEY, D.; HUGHES, R.J.; MOORE, R.J. **Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease**. Applied Microbiology Biotechnology, v.98, p.4301-4310, 2014.
- SUGIHARTO, S.; YUDIARTI, T.; ISROLI, I. **Functional properties of filamentous fungi isolated from the indonesian fermented dried cassava, with particular application on poultry**. Mycobiology, v.43, n.4, p.415-422, 2015.