



## **CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DA MICROBIOTA DE FRANGOS: PERFIL ENZIMÁTICO E ANTOGONISTA FRENTE À PATÓGENOS**

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>, Solange Martins de Souza<sup>2</sup>, Danne Kelle Siqueira Lima<sup>2</sup>, Tawanne Monteiro da Silva<sup>2</sup>, Tamires Maria dos Santos<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 avaliar o perfil enzimático de fungos naturalmente encontrados nos intestinos de frangos, bem como seu potencial antagonista frente à patógenos. Doze aves adultas foram sacrificadas e amostras de conteúdo intestinal foram obtidas para o isolamento microbiano. Posteriormente, para avaliação enzimática foi utilizado meio YNB acrescido de 0,2% de amido solúvel. Os fungos foram cultivados no centro da placa com o meio de cultura cuja única fonte de carbono era o amido. Leituras foram realizadas após 24, 48 e 72h de incubação. A atividade amilolítica foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro. Determinou-se a atividade antagonista dos isolados obtidos frente a três cepas de enterobactérias patogênicas. Os fungos que apresentaram diâmetros de colônia superiores aos demais quando cultivados no meio com amido foram *Rhizomucor* spp. e duas cepas de *Aspergillus* spp., todos provenientes do intestino delgado das aves (P<0,05). De forma semelhante ao halo da colônia, os tempos diferiram entre si (24h < 48h < 72h) (P<0,05). Não foi observado efeito significativo para os tratamentos testados (fungo e tempo de incubação) para o índice de atividade enzimática (IA). Também não observou-se atividade antagonista para os isolados testados. Futuros estudos devem ser feitos verificando a habilidade enzimática frente a outras fontes de carbono e atividade antagonista frente a outras cepas patogênicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aditivo microbiano; avicultura; cepa fúngica; enzimas; nutrição

**ABSTRACT:** The aim of this study was the enzymatic profile of fungi in chick intestines, as well as their potential antagonist against pathogens. The twelve adult birds were sacrificed and the intestine samples were detached for microbial isolation. Subsequently, YNB medium plus 0.2% soluble starch was used for enzymatic evaluation. The fungi were grown in the center of the plate with the only source of carbon source was starch. Readings are completed after 24, 48 and 72 h of incubation. Amylolysis was used to quantify the temperature of the soil around the colony using a meter. The antagonistic activity of the substrates against three strains of pathogenic enterobacteria was determined. The fungi that have colony diameters are superior to those grown when cultivated in the medium with *Rhizomucor* spp. and two strains of *Aspergillus* spp., all from the small intestine of birds (P<0.05). Similar to the halo of the colony, the times differed from each other (24h <48h <72h) (P<0.05). No significant effect was achieved for the tested assays (time and incubation duration) for enzyme activity index (AI). There was also no observed antagonistic activity for the tests tested. Future studies should be performed to verify the enzymatic capacity against other carbon sources and antagonistic activity against other pathogenic strains.

**KEYWORDS:** Enzymes, fungal strain; microbial additive; nutrition, poultry farming

## INTRODUÇÃO

O aproveitamento de um nutriente pela ave depende da digestão e absorção de macromoléculas, o que requer hidrólise enzimática. Sabe-se que a disponibilidade da energia proveniente da metabolização de carboidratos é altamente dependente da idade, em decorrência do perfil de atividade da amilase no pâncreas e no intestino delgado (Longo et al., 2005).

Visando otimizar a digestibilidade dos nutrientes, tem-se utilizado cada vez mais enzimas exógenas na alimentação de aves de postura e/ou corte (Fernandes et al., 2017; Leite, 2009). Nesse sentido, probióticos tornam-se uma alternativa interessante na cadeia da avicultura uma vez que trata-se da inclusão de microrganismos vivos, que podem ser expressivos na produção de exoenzimas como amilase, celulase e pectinase (Almeida et al., 2014; Leite, 2009).

Contudo, um microrganismo probiótico requer outras qualidades, como não ser patogênico, estimular sistema imunológico, se manter viável no trato digestivo, bem como competir com a microbiota maléfica. Dessa forma, objetivou-se avaliar o potencial probiótico de isolados fúngicos oriundos do intestino de frangos da linhagem Cobb 500.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás, 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.

O arranjo adotado no ensaio foi de parcela subdividida 11x3, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo avaliados onze isolados fúngicos e três tempos de incubação (24, 48 e 72h). Foram adotadas três repetições por tratamento.

Para determinação da produção de amilase, foi utilizado meio YNB acrescido de 0,2% de amido solúvel. Os cultivos foram incubados a 37°C, e após 24, 48 e 72h de incubação, a revelação foi realizada pela sublimação de cristais de iodeto de potássio depositados nas tampas das placas. A atividade amilolítica foi avaliada pela medição da zona clara formada ao redor da colônia utilizando um paquímetro. O restante do meio não degradado permaneceu corado de violeta Hankin & Anagnostakis (1975). Calculou-se o índice de atividade enzimática (I.A.) de cada microrganismo, dividindo-se os valores das medidas do halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia para cada período de avaliação (Lopes et al., 2009).

Para o ensaio de antagonismo foi utilizada a metodologia conforme descrito por Ramirez (2005). Foi considerada formação de halo de inibição do crescimento distâncias superiores a 10mm de diâmetro. Os isolados patogênicos utilizados no referido ensaio foram: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*.

Após análise exploratória e transformação logarítmica dos dados (LogX+10) comparou-se os índices de atividade enzimática (I.A) por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para o ensaio antagônico adotou-se estatística descritiva. Todas as análises foram processadas em software Assistat 7.7.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o halo da colônia (diâmetro) não foi observada interação significativa. Avaliando os fatores isoladamente, como era de se esperar, os tempos (24, 48 e 72 horas) diferiram estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ), de forma que o maior desenvolvimento das colônias foi observado com o maior tempo de incubação. Os fungos que apresentaram diâmetros superiores (HC) aos demais quando cultivados no meio com amido foram *Rhizomucor* spp. e duas cepas de *Aspergillus* spp., todos provenientes do intestino delgado das aves ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 – Diâmetros médios (cm) de colônia e de degradação do amido de diferentes fungos isolados do intestino de frangos da linhagem Cobb 500

Fungos	HC	HD
<i>Aspergillus terreus</i> IG	1,60B	1,72B
<i>Aspergillus</i> spp. IG	0,19B	0,37B
<i>Rhizomucor</i> spp. ID	3,44A	3,89A
<i>Aspergillus</i> spp. ID1	1,71B	2,42A
<i>Aspergillus flavus</i> ID	1,51B	2,48A
<i>Tricophyton</i> spp. IG	0,81B	1,12B
<i>Aspergillus</i> spp. ID2	2,94A	3,48A

<i>Aspergillus</i> spp. ID3	2,71A	3,41A
<i>Aspergillus fumigatus</i> IG1	1,65B	2,10A
<i>Aspergillus fumigatus</i> ID	0,58B	0,66B
<i>Aspergillus fumigatus</i> IG2	1,94B	2,42A
Coefficiente de Variação (%)	106,28	83,26

Nota: HC = Halo da colônia fúngica \ HD = Halo de degradação do amido. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ).

Para halo de degradação do amido, a interação dos fatores também não foi significativa, indicando que o tempo de incubação e a cepa fúngica não possuem relação quando se avalia a respectiva variável. De forma semelhante ao halo da colônia, os tempos diferiram entre si (24h < 48h < 72h) (P<0,05). Os fungos que destacaram-se na degradação do amido (HD) foram: *Rhizomucor* spp. e outras seis cepas de *Aspergillus* spp..

Não foi observado efeito significativo para os tratamentos testados (fungo e tempo de incubação) para o índice de atividade enzimática (IA). A interação dos fatores também não foi significativa. Observou-se bons índices de atividade amilolítica para 90,9% dos isolados testados a partir de 48h de incubação, uma vez que para uma boa produção de enzimas espera-se IA's maiores que 1 (Almeida et al., 2014).

Nenhum dos isolados fúngicos testados mostrou-se eficiente em inibir o desenvolvimento das cepas de enterobactérias testadas: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Observou-se a capacidade de sobrevivência em sinergismo entre os isolados fúngicos e bacterianos. Entretanto, não houve formação de halo inibidor, e, ambas colônias desenvolveram no meio de cultura.

### CONCLUSÕES

Os fungos testados neste ensaio apresentam potencial probiótico, uma vez que são expressivos na produção de amilase. Contudo, para real indicação outros testes fazem-se necessários, como produção de micotoxinas, viabilidade no trato digestivo e antagonismo frente a outras cepas patogênicas.

### AGRADECIMENTOS

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

### LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, P.N.M.; FREITAS, C.E.S.; ABRÃO, F.O.; RIBEIRO, I.C.O.; VIEIRA, E.A.; GERSEEV, L.C.; DUARTE, E.R. **Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais**. Revista Caatinga, v.27, p.202-207, 2014.
- FERNANDES, J.I.M.; CONTINI, J.P.; PROKOSKI, K.; GOTTARDO, E.T.; CRISTO, A.B.; PERINI, R. **Desempenho produtivo de frangos de corte e utilização de energia e nutrientes de dietas iniciais com milho classificado ou não e suplementadas com complexo enzimático**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.69, n.1, p.181-190, 2017.
- LEITE, P.R.C. **Digestibilidade dos nutrientes da ração e desempenho de frangos de corte alimentados com rações formuladas com milho ou sorgo e suplementadas com enzimas**. Dissertação (Universidade Federal de Goiás), 80f. 2009.
- LONGO, F.A.; MENTEN, J.F.M.; PEDROSO, A.A.; FIGUEIREDO, A.N.; RACANICCI, A.M.C.; GAIOTTO, J.B.; SORBARA, J.O.B. Carbohydrates in the diets of newly hatched chicks. Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, p.123-133, 2005.
- LOPES, V.R.O.; SOUZA, C.G.; AMORIM, M.V.F.S.; MARTINS, C.M.; PINTO, G.A.S. **Análise Enzimática de Fungos Isolados de Solo de Manguezal**. Encontro de pesquisa e pós-graduação, 9, Anais... Fortaleza, 2009.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. **The use of solid media for detection of enzyme production by fungi**. Mycologia, v.67, p.597-607, 1975.
- RAMIREZ C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.