



Sobrevivência de *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Saccharomyces boulardii* em água de Tanque de criação de peixe

Souza, Diego Moreira¹; Roos, Talita Bandeira¹; Sturbelle, Régis Tuchtenhagen¹; Conceição Fabrício Rochedo²; Leite, Fábio Pereira Leivas¹.

¹Dept^o de Microbiologia – UFPEL

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

²Centro de Biotecnologia – UFPEL

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

1. INTRODUÇÃO:

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes acepções (Coppola & Gil-Turnes, 2004). O termo prebiótico é utilizado, a diferença de probiótico, para designar ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou um número limitado de espécies bacterianas no cólon (Gibson & Roberfroid, 1995), e o termo simbiótico para designar produtos que contêm probióticos e prebióticos associados. Como a palavra sugere sinergismo, ela deveria ser restringida a produtos em que o componente prebiótico favoreça seletivamente o probiótico (Schrezenmeier & De Vrese, 2001). Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese (Coppola & Gil-Turnes, 2004). Em aquicultura, o termo probiótico se define como um suplemento microbiano formado por um cultivo mono ou poli de microrganismos selecionados que são adicionados à dieta alimentar com o propósito de estimular as comunidades microbianas presentes nos sistemas de digestão (Graeff & Mondardo, 2006). A utilização de antibióticos no controle de infecções tem apresentado sucesso limitado na prevenção ou cura de infecções na aquicultura. O uso expressivo de antibióticos no controle de doenças ou como promotores de crescimento aumenta a pressão de seleção sobre os microrganismos, levando naturalmente ao aumento da resistência bacteriana. Além da proliferação das bactérias resistentes, após a morte das não resistentes ao antibiótico, há também a possibilidade de transferência dos genes de resistência a outras bactérias nunca expostas ao antibiótico (Verschuere et al. 2000a).

Diversas alternativas ao uso de antibióticos no controle de doenças têm sido propostas com relativo sucesso na aquicultura, entre elas, o uso de probióticos (Nikoskelainen et al., 2001; Gram et al., 1999; Gildberg et al., 1997). A estimulação microbiana é uma ferramenta viável para reduzir ou eliminar a incidência de microrganismos patogênicos e também constitui uma alternativa para a substituição de agentes quimioterápicos na prevenção de enfermidades (Balcazar, 2002). O *Bacillus cereus* var. *toyoi* tem como principal vantagem sobre as bactérias ácido lácticas, na elaboração de probióticos, sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior

sobrevivência durante o trânsito estomacal (Hoa et al., 2000), e durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (Gil Turnes et al., 1999). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica utilizada na prevenção e tratamento de diversas doenças gastrintestinais (Lourenshattingh e Viljoen, 2001), que mantêm suas propriedades probióticas ainda quando administrada junto com antimicrobianos (Rolfe, 2000). O objetivo do trabalho foi avaliar a sobrevivência dos probióticos na água proveniente dos tanques de criação de peixes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Em uma primeira etapa, as culturas de *B. cereus* e *S. boulardii* foram semeadas em meio NYSM (Yousten's médium) e YPD (Levedura, Peptona e Dextrose), respectivamente preparados com água proveniente de tanques criatórios de peixe (ATP) e com água destilada como controle (ADC) para avaliar a viabilidade dos probióticos. Numa segunda etapa, foram realizados dois tratamentos e dois controles mantidos a temperatura ambiente: Inicialmente as culturas de *B. cereus* e *S. boulardii* continham, respectivamente, 1×10^8 e $6,4 \times 10^8$ UFC/mL. Um tratamento na proporção de 1:10 de *B.cereus* com ATP, outro tratamento idêntico porém com *S.boulardii*, e um controle para cada probiótico preparado com ADC. Cada tratamento foi titulado a cada quinze dias, para avaliar quantitativamente sua viabilidade. *B.cereus* incubado por 24 horas a 37°C e *S.boulardii* a 28°C por 48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Avaliação do Título dos probióticos na água destilada (ADC) e água de peixe (ATP)

Cultivos	1 ^a Titulação	2 ^a Titulação	3 ^a Titulação	4 ^a Titulação	5 ^a Titulação	6 ^a Titulação
Bt + H ₂ O destilada (ADC)	2×10^7	4×10^7	2×10^7	$2,6 \times 10^7$	4×10^7	$1,2 \times 10^7$
Bt + H ₂ O Peixe (ATP)	8×10^6	4×10^6	-	$1,6 \times 10^6$	8×10^7	8×10^5
Sb + H ₂ O destilada (ADC)	2×10^8	8×10^7	$1,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	4×10^6	6×10^6
Sb + H ₂ O Peixe (ATP)	1×10^8	SC*	SC*	SC**	4×10^2	SC***

Bt: *Bacillus cereus* var. Toyoi, Sb: *Saccharomyces boulardii*, ADC: Água destilada controle e ATP: Água dos tanques criatórios de peixes SC*: não houve crescimento nas diluições -4, -5 e -6 SC**: não houve crescimento nas diluições -2, -3 e -4, SC***: não houve crescimento nas diluições -1, -2 e -3.

Na primeira etapa pode se observar que os dois microrganismos eram capazes de crescer em meio preparado com ATP. Na segunda etapa, conforme os dados apresentados na tabela acima, evidenciamos que durante o período de experimento a contagem foi diminuindo gradativamente. Observou-se que o *B. cereus* cultivado no tratamento com água destilada manteve o título inicial, enquanto no tratamento com ATP

diminuiu 1 logaritmo. A cultura de *S. boulardii* mantida no tratamento com água destilada diminuiu 2 logaritmos, quando no tratamento com ATP reduziu 6 logaritmos e chegando a ausência do probiótico no final do terceiro mês de experimento.

A interação ambiente x hospedeiro em um ambiente aquático é complexa, pois ambos dividem o mesmo ecossistema. Os microrganismos presentes na água influenciam a microbiota do intestino do hospedeiro e vice-versa. Os microrganismos da flora intestinal dos hospedeiros parecem ser aqueles presentes no ambiente ou no alimento e que conseguem sobreviver e se multiplicarem (Verschuere et al., 2000a).

Vários autores têm demonstrado o efeito de probióticos sobre a diminuição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos, geralmente utilizando a inoculação de patógenos específicos (Gildberd et al., 1997; Gram et al., 1999; Verschuere et al., 2000b; Nikoskelainem et al., 2001). Deve-se ressaltar que, em animais mantidos em boas condições de manejo (nutricionais e sanitárias), muitas vezes não são constatados efeitos da inclusão de probióticos sobre seu desempenho (Lima et al., 2003), pois, nessas situações, a possibilidade de contato dos animais com microrganismos patogênicos é menor (Loddi et al., 2000; Zuanon et al., 1998).

Nesses casos, pode não haver efeito da inclusão de probióticos nas rações sobre o desempenho animal. Meurer et al. (2004) não verificaram efeito da adição da *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho de tilápias-donilo durante o período de reversão sexual e atribuíram esse resultado à ausência de microrganismos potencialmente patogênicos no ambiente experimental. Entretanto, Lara-Flores et al. (2003) encontraram efeito da *S. cerevisiae* no desempenho e na sobrevivência de alevinos de tilápia-do-nilo, mas, neste caso, foram aplicados alguns fatores de estresse.

4. CONCLUSÕES

Portanto, se a água dos tanques for renovada freqüentemente esses probióticos são viáveis, porém se não houver a renovação freqüente, não se pode garantir a repetibilidade dos resultados.

Muitos experimentos são ainda necessários na área da aquicultura, este estudo preliminar nos possibilitou ter informações importantes para que se de continuidade a pesquisa. Projetos futuros incluem fornecer esses dois probióticos aos peixes visto que eles são viáveis na água do tanque dos peixes, portanto pretende-se observar algum efeito benéfico aos animais com esses probióticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COPPOLA, M. M. E CARLOS GIL-TURNES. PROBIÓTICOS e resposta imune. Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004
- HOA, N.T. et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.66, n.12, p.5241-5247, 2000.
- GRAEFF, A. E MONDARDO, M. Influência do probiótico no crescimento das carpas comum (*Cyprinus carpio* L., 1758) na fase de recria - Influence of the probiotic in growth of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) in fase to create again, 2006.
- BALCÁZAR, J.L. Uso de probióticos em acuicultura: aspectos generales. In: I Congreso Iberoamericano Virtual De Acuicultura. Anais...CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), p. 877-881.
- GIL-TURNES, C. et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v.30, n.1, p.11-14, 1999.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*, Amsterdam, v.34, n.9, p.791-796, 2001.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E. et al. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, v.352, p.279-285, 1997.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGARD, B. et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.3, p.969-9732, 1999.

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMANMENDEZ, B.E. et al. Use of bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v.216, n.1-4, p.193-201, 2003.

LIMA, A.C.F.; PIZAURO JR., J.M.; MACARI, M. et al. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

LODDI, M.M.; GONZALES, E.; TAKITA, T.S. et al. Uso de probiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. *Revista BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, v.29, n.4, p.1124-1131, 2000.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M. et al. Uso da *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. Anais... Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004 (CD-ROM).

NIKOSKELANEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. et al. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.6, p.2430-2435, 2001.

Probióticos e resposta imune. Mario de Menezes Coppola e Carlos Gil Turnes. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.130, n.2, p. 396S-402S, 2000.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.4, p.655-671, 2000a.

VERSCHUERE, L.; HEANG, H.; CRIEL, G. et al. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.3, p.1139-1146, 2000b.

ZUANON, J.A.S.; FONSECA, J.B.; ROSTAGNO, H.S. et al. Efeito de promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.27, n.5, p.999-1005, 1998.