

2.12.99 - Microbiologia.

## BACTÉRIAS COM POTENCIAL BIORREMEIADOR ISOLADAS DE AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE GADO LEITEIRO.

Gabriela Fernandes de Paiva Oliveira<sup>1\*</sup>, Laura Fonseca Silva<sup>1</sup>, Tatiana Alves Toledo<sup>2</sup>, Dionéia Evangelista Cesar<sup>3</sup>, Alessandro Del'Duca<sup>4</sup>

1. Estudante de IC do *Campus* Juiz de Fora – IF Sudeste MG.
2. Técnica de Laboratório de Biologia do *Campus* Juiz de Fora – IF Sudeste MG.
3. Professora do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos – UFJF.
4. Professor do Núcleo de Biologia do *Campus* Juiz de Fora – IF Sudeste MG/Orientador.

### Resumo:

O *Compost Barn* (CB) é um sistema alternativo de confinamento de gado sobre camas formadas, principalmente, de serragem. Este sistema apresenta grande quantidade e complexidade de micro-organismos. Alguns destes têm a capacidade de produzir substâncias antibióticas que podem interferir no crescimento e colonização de outros. O objetivo do trabalho foi isolar bactérias que possam inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas. Através de dois métodos *in vitro* de antagonismo, foram testados 146 isolados bacterianos de dois CB. Destas, 51 mostraram capacidade de controlar o crescimento de pelo menos um dos três potenciais patógenos de mamíferos testados. Com estes resultados, podemos concluir que há a possibilidade de isolarmos bactérias com características probióticas e/ou biorremediadoras do CB.

**Autorização legal:** Não se aplica.

**Palavras-chave:** *Compost Barn*; Probiótico; Biorremediador.

**Apoio financeiro:** CNPq.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** IF Sudeste MG – *Campus* Juiz de Fora.

### Introdução:

O *Composto Barn* (CB) é um sistema moderno e bem sucedido de confinamento para gado leiteiro, que tem como objetivo proporcionar conforto para o rebanho. Neste sistema, o gado fica confinado em um local coberto e forrado por enormes camas, formadas, principalmente, por camadas espessas de serragens (JANNI *et al.*, 2007).

É imprescindível que o local seja mantido seco, pois a umidade pode compactar a serragem, prejudicar o casco do gado e propiciar a mastite e outras doenças devido a sua aderência aos animais confinados (SANTOS *et al.*, 2015).

A serragem do CB pode ser considerada uma “cama viva”, pois muitos micro-organismos vivem nesse ambiente devido a condições propícias (CESAR *et al.*, 2015). Esses micro-organismos podem ter características biorremediadoras ou probióticas, influenciando na proliferação de outros por inibição ou competição (GATESOUBE, 1999).

A identificação das bactérias biorremediadoras e probióticas seria um passo importante para o controle dos agentes patogênicos, que podem prejudicar o objetivo principal deste tipo de sistema. As doenças recorrentes poderiam trazer problemas corriqueiros de saúde do gado e proporcionar-lhes desconforto.

A finalidade do trabalho foi isolar bactérias da serragem de CB e testá-las quanto ao seu potencial em inibir agentes patogênicos para mamíferos.

### Metodologia:

#### LOCAL DA COLETA

As amostras de CB foram obtidas de duas fazendas que confinam o gado leiteiro neste tipo de sistema. Estas fazendas se localizam na região Sul de Minas Gerais.

## ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

As amostras de serragem do CB foram coletadas em frascos estéreis e mantidas refrigeradas até o procedimento de isolamento das bactérias em laboratório. Alíquotas de 2g de serragem foram homogenizadas, sonificadas e diluídas em série (diluições seriadas até  $10^{-7}$ ) em 0,9 % de solução salina estéril (121°C por 15 minutos) e plaqueadas em ágar triptona de soja (TSA – Difco®) antes de serem incubadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas. Depois de verificar o crescimento, as colônias de bactérias foram caracterizadas macroscopicamente, isoladas, diferenciadas pela coloração de Gram e reisoladas para verificar a pureza do isolado. Em seguida, os isolados puros foram armazenados a -20 °C em meio *Skim Milk* 20 % até a realização dos testes *in vitro* de antagonismo.

## TESTES *IN VITRO* DE ANTAGONISMO

As bactérias isoladas foram submetidas a dois métodos *in vitro* de antagonismo: (a) por cruzamento de estrias (DECAMP *et al.*, 2008) e (b) por dupla-camada (BOOTH *et al.*, 1977). Os dois testes foram realizados para verificar ação antagonista contra *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*, ambos potenciais patógenos de mamíferos.

O método de cruzamento de estrias foi realizado com as bactérias testes isoladas e os potenciais patógenos (um por placa). As inoculações foram feitas em placas de Petri com Ágar Nutriente (AN - Difco®) e incubadas a 36 °C por 24 horas. Verificou-se, então, a inibição ou não do crescimento dos patógenos no local do cruzamento das estrias.

O método de dupla-camada foi realizado para verificar se os isolados bacterianos testes são capazes de produzir substâncias antagonistas e estas inibirem os potenciais patogênicos. Para isso, as bactérias testes foram cultivadas e inoculadas com auxílio do replicador de Steer em AN e incubadas a 36 °C por 18 horas. Após o crescimento, as colônias foram mortas por exposição a clorofórmio por 30 minutos, seguido de exaustão por evaporação por mais 30 minutos do clorofórmio residual. As bactérias patogênicas, já crescidas em meio semissólido, foram então adicionadas (uma por placa) às placas com as bactérias testes mortas em uma dupla camada, com nova incubação a 36 °C por 24 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto ao

crescimento das bactérias patogênicas ou formação de halos de inibição.

## Resultados e Discussão:

Foram obtidos 146 isolados bacterianos do CB para serem realizados os testes de antagonismo.

Após a realização dos testes de cruzamento de estrias, 51 isolados apresentaram indícios para controlar o crescimento de pelo menos um potencial patógeno utilizado no teste.

Os testes de antagonismo através do método de dupla-camada mostraram que três bactérias conseguiram inibir o crescimento de *Salmonella* sp., devido à presença do halo de inibição (Figura 1). Estas três bactérias são coincidentes com aquelas que já haviam dado indícios de controle dos patógenos pelo teste de cruzamento de estrias.

O maior potencial de controladores de crescimento foi encontrado em bactérias que foram caracterizadas como Gram positivas, sendo aproximadamente 40 % destas bactérias isoladas classificadas como CGP (Cocos Gram Positivos) e 37 % como BGP (Bacilos Gram Positivos).

Os resultados obtidos representam a seleção de bactérias capazes de controlar os patógenos sem o uso de antibióticos. Esse é o primeiro passo na busca da diminuição da resistência bacteriana adquirida com os métodos convencionais de combate aos patógenos, visto que este fator pode estar relacionado a um maior potencial de virulência e menor eficiência da ação do antibiótico utilizado (ASM, 2000; DINIZ *et al.*, 2003).

Estes resultados impulsionam a continuidade das pesquisas nesta linha para que se consiga obter bactérias benéficas e endêmicas ao sistema. Há um consenso de que essas bactérias podem ser mais propensas a serem incorporadas nos animais, provavelmente devido à sua maior capacidade em se adaptar ao ambiente de onde foram isoladas. Este fato as torna organismos preferenciais para serem pesquisados e isolados para aplicações como probióticos e/ou biorremediadores (Carnevali *et al.*, 2004). Ademais, contribui para a melhora do sistema CB, que prospera no mercado de produção leiteira, beneficiando o produtor e o animal.

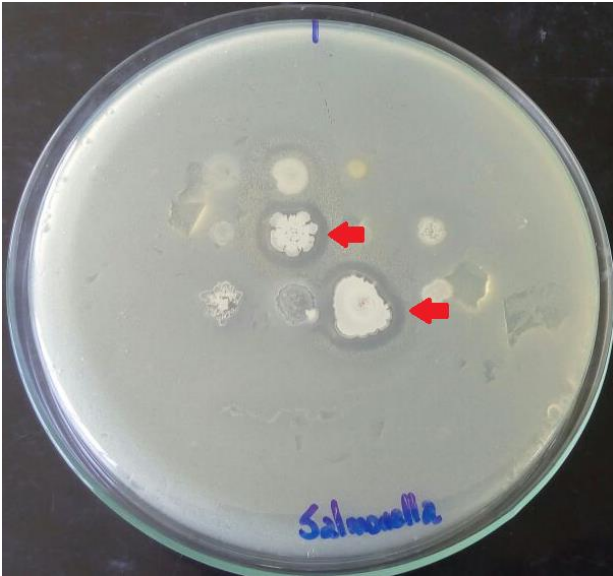


Figura 1. Teste *in vitro* de antagonismo por Dupla-Camada. Em destaque, os halos de inibição formados por dois isolados bacterianos contra o crescimento de *Salmonella* sp.

### Conclusões:

Foram encontrados possíveis potenciais biorremediadores e/ou probióticos nestes ambientes de produção de gado leiteiro. Essa possibilidade de encontrar bactérias controladoras do crescimento de potenciais patogênicos é fundamental para a diminuição do uso indiscriminado de antibióticos nos ambientes.

### Referências bibliográficas

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (ASM). **Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective**. Report From the American Academy of Microbiology. Washington, American Society for Microbiology, 2000.

BOOTH, S.; JOHNSON, J.; WILKINS, T. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 11, 718-724, 1977.

CARNEVALI, O.; ZAMPONI, M.; SULPIZO, R.; ROLLO, A.; NARDI, M.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; CAGGIANO, M.; POLZONETTI, A.; CRESCI, A.; Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. **Aquaculture International**, 12, 377-386, 2004.

CESAR, D.; MENDONÇA, L.; DEL'DUCA, A.; DIAS, R.; LOUZADA, A.; SENRA, M.; CARNEIRO, J.; GUIMARÃES, A. Comunidade microbiana e parâmetros físicos e químicos nos sistemas de *compost barn*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE,

13, 2015, Porto Alegre. **Anais XIII Congresso Internacional do Leite**. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, 2015.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.; LAVENS, P. Probiotic for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, 39, 334-338, 2008.

DINIZ, C.; ARANTES, R.; CARA, D.; LIMA, F.; NICOLI, J.; CARVALHO, M.; FARIAS, L. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes and Infection**, 5, 19-26, 2003.

GATESOUBE, F. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, 180, 147-165, 1999.

JANNI, K.; ENDRES, M.; RENEAU, J.; SCHOPER, W. Compost dairy barn layout and management recommendations. **Applied Engineering in Agriculture**, 23, 97-102, 2007.

SANTOS, M. Mastite em sistemas de Compost Barn. **Inforleite**, 57, 38-40, 2015.