

# ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, ESTUDOS FISIOLÓGICOS, CARACTERIZAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA AÇÃO DO FERMENTADO DE CEPAS INTESTINAIS DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*)

Allan Henrique Panisson<sup>1</sup>, Silmara Cadene<sup>1</sup>, Elza Maria Galvão Ciffoni<sup>2</sup>.

1 Acadêmicos do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR);

2 Médica Veterinária, Prof. MSc. da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

elzaciffoni@utp.br

---

**RESUMO:** Pro e prebióticos são imuno suplementos conhecidos por inibir microrganismos patogênicos ou tornar o indivíduo mais resistente pela imunoestimulação. Dentre os grupos de microrganismos utilizados como probióticos, as bactérias ácido-láctica (BAL) estão sendo amplamente estudadas, por agirem contra patógenos pela produção de ácidos, principalmente o ácido láctico e pela produção das bacteriocinas. O *Enterococcus faecalis* esta incluída no grupo das BAL, é homofermentativo e resistente a bile até 40%. O objetivo desta pesquisa foi o isolamento e a caracterização bioquímica de cepa probiótica de avestruz (*Struthio camelus*), com o intuito de estudar a ação do fermentado como provável prebiótico. Dentre as cepas isoladas o fermentado de *Enterococcus faecalis* foi testado frente aos patógenos *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. Inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

**Palavras-chave:** Avestruz (*Struthio camelus*), bactérias ácido lácticas, *Enterococcus faecalis* e prebióticos.

---

**ABSTRACT:** Pro and prebiotics are immune supplements known to inhibit pathogenic microorganisms or make the individual more resistant by immunostimulation. Among the groups of microorganisms used as probiotics, lactic acid bacteria (LAB) are being widely studied, for acting against pathogens by producing acids, mainly lactic acid and the production of bacteriocins. *Enterococcus faecalis* is included in the group of LAB, is homofermentative and bile resistant up to 40%. The objective of this research was the isolation and biochemical characterization of probiotic ostrich (*Struthio camelus*), with the aim of studying the action of fermented as the likely prebiotic. Among the strains isolated from the fermentation of *Enterococcus faecalis* was tested against the pathogens *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. Inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Ostrich (*Struthio camelus*), lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis* and prebiotics.

---

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a crescente preocupação com a saúde e qualidade de vida, levou as pessoas a buscarem alimentos mais saudáveis e até com alguma propriedade funcional (SILVA, 2007). Em vista disso, houve um crescente fomento ao desenvolvimento de novos produtos e para muitos deles, a biotecnologia foi a chave para o sucesso.

Uma das grandes áreas da biotecnologia voltada à produção alimentícia é a utilização dos probióticos e prebióticos, que podem acrescentar propriedades funcionais em alimentos, e de acordo com Bonneau e Laarvard (1999), são utilizados para melhorar as condições fisiológicas e auxiliar no combate a patógenos. Apesar de terem as mesmas aplicações, são aditivos alimentares distintos. Os probióticos são considerados microrganismos, dentre elas as bactérias ácido-láticas (BAL) que são descritas por serem cocos ou bacilos, gram positivos e não esporuladas que, pela fermentação da lactose, produzem ácido láctico como principal produto final, baixando o pH do meio (MAGNUSSON, 2003). Os prebióticos, por sua vez, são considerados substâncias que o organismo não consegue digerir, que estimulam o crescimento e a atividade de probióticos presentes no organismo e não são metabolizáveis no intestino delgado, chegando ao intestino grosso e servindo como fonte de carbono (ZUBILLAGA *et al.*, 2001). Um grupo específico de prebióticos pode apresentar ação contra bactérias gram negativas, como o grupo das bacteriocinas (Luders *et al.* citados por De Vuyst *et al.*, 2004), metabólitos produzidos a partir da fermentação de bactérias ácido-láticas como peptídeos ou proteínas com ação bactericida ou bacteriostática (Bennik *et al.*, 1998 citado por Ferreira, 2005).

Reque (1999) cita que a microflora do intestino de aves é complexa e as interações entre diferentes tipos de organismos é mais complicada. Há algumas décadas várias drogas vêm surgindo como promotoras de crescimento e melhoradoras do desempenho dos animais. Porém, a alta incidência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos encontradas em produtos alimentícios de origem animal, assim como a constatação do aumento da resistência dos patógenos à antimicrobianos utilizados como suplementos nas rações, levaram a questionar a utilização destes (SANTOS & GILL-TURNES, 2005).

O fato de não haver muitas pesquisas relacionadas à melhoria na produção de aves, principalmente focadas na estruicultura, é um estímulo aos pesquisadores deste projeto, cujo objetivo foi isolar, identificar a cepa probiótica de avestruz (*Struthio camelus*) e estudar a ação do fermentado como provável prebiótico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram colhidas amostras intestinais de 10 avestruzes (*Struthio camelus*) aparentemente saudáveis, que não tinham recebido antibióticos recentemente. Os animais foram selecionados aleatoriamente da Fazenda Pé-da-Serra de um plantel com 45 animais adultos, criados no

sistema extensivo em piquetes e alimentados com silagem de milho (*Zea mays*) e pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*).

As amostras intestinais foram colhidas com *swab* estéril, introduzido diretamente na cloaca através de uma sonda de tubo de pvc 2 polegadas, com aproximadamente 20 cm, esterilizada. Após colheita, os *swabs* foram transportados em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharp – OXOID) adicionado de 5% de bile canina (colhida no laboratório de patologia clínica da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP) e cristalizada em estufa de circulação<sup>1</sup> a 60°C/uma semana), estéril e autoclavado a 121°C, por 15 min. No laboratório de microbiologia da UTP os tubos foram para estufa bacteriológica para crescimento à 37°C/24 horas.

As bactérias resistentes a bile foram isoladas pela técnica da semeadura, com esgotamento da alça de platina, em placas com ágar MRS à 37°C/24 horas em estufa bacteriológica<sup>2</sup>. Após este período as cepas foram submetidas à coloração de gram para identificação morfológica. As cepas isoladas e identificadas foram incubadas em caldo MRS, verificando-se o pH (com pHmetro)<sup>3</sup> após fermentação por 24 horas a 37°C em estufa. Realizou-se a contagem de UFC através de diluições sucessivas em águas peptonada. O resultado da contagem de colônias foi obtido pela fórmula  $Y = (F \times Z) \div V$ . Onde Y significa o valor de UFC/mL, Z o fator de diluição da amostra e V o volume de porção do teste (neste caso 1 mL).

Para avaliação da atividade antimicrobiana a cepa isolada foi inoculada em caldo MRS e mantida por 24 horas a 37°C, e em seguida transferiu-se uma alíquota ao nível de 1% (v/v) para frasco contendo 25 mL de caldo MRS e incubada a 37°C por 24 horas. As cepas patogênicas (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 35218)<sup>4</sup>, foram previamente ativadas em caldo nutrientes (meio BHI) e semeadas em placas de petri contendo ágar nutriente (Mueller-Hinton). Em seguida, de forma asséptica, fez-se um orifício no centro da placa, com 0,5cm de diâmetro, onde se adicionou 30 µL do caldo MRS com as cepas isoladas.

As placas foram incubadas a 37°C, e a medida da zona clara ao redor do orifício o (halo de inibição) foi realizada com 6, 12, 18 e 24 horas, e mensurou-se o diâmetro em centímetros.

---

<sup>1</sup> Estufa de circulação de ar mod. 400/3ND, Nova Ética. [www.novaetica.com.br](http://www.novaetica.com.br)

<sup>2</sup> Estufa para Cultura Bacteriológica mod. 502A, Fanem. [www.fanem.com.br](http://www.fanem.com.br)

<sup>3</sup> pHmetro mod. Q400A, Quimis. [www.quimis.com.br](http://www.quimis.com.br)

<sup>4</sup> New Prov Produtos para Laboratório, [www.newprov.com.br](http://www.newprov.com.br)

A cepa selecionada na avaliação da atividade antimicrobiana foi inoculada em frasco erlenmeyer contendo 100mL do meio MRS, e incubada à 37°C na estufa bacteriológica.

Após 24 horas de fermentação o material foi centrifugado<sup>5</sup> por 30min a 3000rpm e o sobrenadante filtrado em papel milipore 0,22µm e concentrado a 50% em estufa de circulação de ar, sob temperatura de 60°C. Foram realizados dois testes com o concentrado do fermentado.

A avaliação da atividade bacteriostática do concentrado do fermentado da cepa selecionada, foi realizada com a adição de 30µL nos orifícios (0,5 cm) em placa com meio Mueller-Hintom e semeada com patógeno. A verificação da formação de halo foi realizada com 6, 12, 18 e 24 horas de incubação.

Na atividade bactericida, os patógenos foram semeados em placa (com ágar Mueller-Hintom) e incubados na estufa bacteriológica, à 37°C/ 24 horas; após este período adicionou-se uma gota de 10 µL do concentrado sobre os patógenos e incubados novamente, com os períodos de 6, 12, 18 e 24 horas foi realizada a verificação do efeito do concentrado nos patógenos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 10 amostras intestinais colhidas de avestruz (*Struthio camelus*) apresentaram cepas resistentes à bile 5%, tendo fermentado o meio MRS, cujo pH foi reduzido para índices abaixo de 5,5 (tabela 1). Segundo MAGNUSSON (2003), as cepas com potencial probiótico devem reduzir o pH por produzirem ácido lático. A tolerância a pH baixo é uma importante característica probiótica juntamente com a resistência à bile para a sobrevivência e crescimento das bactérias no trato digestório (GILLILAND *et al.* 1990)

As cepas foram incubadas em placa com meio MRS, observando-se o crescimento de três colônias distintas: colônias redondas pequenas (0,1 cm) e brancas (cepas 7, 11, 13 e 18) (fig. 01); colônias de tamanho médio ( $\pm$  0,3 cm) e branco leitosas (cepas 9, 10, 15, 16 e 17) (fig. 02) e colônias grandes (0,5cm) amareladas e abauladas e muito leitosas (cepa 12) (fig. 03).

---

<sup>5</sup> Centrifuga mod. DSC -16RV, Presvac. [www.presvac.net](http://www.presvac.net)



**FIGURA 01-** Cepa gram positiva, isolada de cloaca de avestruz (*Struthio camelus*), apresentando colônias redondas e pequenas



**FIGURA 02-** Cepa gram positiva, isolada de cloaca de avestruz (*Struthio camelus*), apresentando colônias de tamanho médio leitosas



**FIGURA 03-** Cepa gram positiva, isolada de cloaca de avestruz (*Struthio camelus*), apresentando colônias abauladas e amarelo leitosas

Na avaliação da atividade antimicrobiana, a cepa 18 apresentou halo de crescimento (0,2cm) inibindo o *Staphylococcus aureus* (fig. 04). Quanto aos outros patógenos analisados, não houve inibição (fig. 05).



**FIGURA 04 - Crescimento da cepa 18, formando halo (0,2 cm) de inibição do patógeno (*Staphylococcus aureus*)**



**FIGURA 05 – Não crescimento da cepa gram positivo (18) pela inibição do patógeno (*Escherichia coli*)**

Quanto às colônias crescidas em placas com meio MRS, notou-se na coloração de Gram que, das 10 amostras colhidas, duas apresentaram cocos gram positivos e cocos gram negativos (20%), uma bacilos gram positivo e bacilos gram negativo (10%), uma diplococos gram positivo e bacilos gram negativo (10%), uma com diplococos gram positivo e cocos-bacilos gram negativos (10%), cinco apresentaram cocos gram positivos e bacilos gram negativos (50%), sendo que uma destas também apresentou colônias de *Candida* sp. (tabela 1).

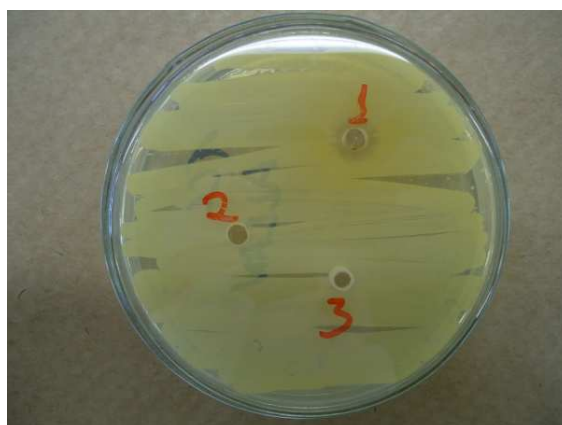
**TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS GRAM POSITIVO ISOLADAS DA CLOACA DE AVESTRUZ (*Struthio camelus*) SELECIONADAS**

| n° de identificação da cepa isolada | Morfologia | pH do caldo MRS após 24 horas de incubação<br>$\bar{x} \pm \sigma$ | Capacidade de hemólise em ágar sangue | Capacidade inibitória frente <i>Staphylococcus aureus</i> |
|-------------------------------------|------------|--|---------------------------------------|---|
| 7                                   | Cocos      | 4,37 ± 0,06  | -                                     | -   |
| 9                                   | Cocos      | 4,38 ± 0,093   | -                                     | -   |
| 10                                  | Cocos      | 4,68 ± 0,1529  | +                                     | -   |
| 11                                  | Cocos      | 4,91 ± 0,1305  | +                                     | -   |
| 12                                  | diplococos | 5,24 ± 0,2451  | +                                     | -   |
| 13                                  | Bacilos    | 4,32 ± 0,1421  | +                                     | -   |
| 15                                  | diplococos | 4,87 ± 0,0931  | +                                     | -   |
| 16                                  | Cocos      | 4,41 ± 0,1157  | -                                     | -   |
| 17                                  | Cocos      | 4,90 ± 0,3565  | +                                     | -   |
| 18                                  | Cocos      | 4,93 ± 0,1462  | +                                     | +   |

**Legenda** - As cepas gram positivas isoladas foram identificadas com números, relacionados ao animal de qual foram retiradas, e verificou-se a morfologia, o pH do caldo MRS após 24 horas à 37°C de incubação (sendo que o pH de fermentação inicial foi de 6,50), a capacidade de hemólise em ágar sangue e a capacidade inibitória frente aos patógenos *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* sendo que o único que apresentou ser sensível à alguma das cepas foi o *Staphylococcus aureus*.

No teste de atividade bacteriostática do concentrado a cepa 18 apresentou halo de inibição (0,3 cm) contra *Staphylococcus aureus* (fig. 06).

De acordo com Reque (1999) a inibição pode ocorrer pela produção do ácido láctico e conseqüente diminuição do pH do meio, pela produção de bacteriocinas que apresentam propriedades bacteriostáticas, e pela produção dos ácidos acético e fórmico.



**FIGURA 06 - Halo de inibição do concentrado do fermentado da cepa 18 (identificado pelo n°1) de *Staphylococcus aureus***

A contagem de UFC no caldo MRS fermentado após 24 horas/37°C de incubação foi de  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL.

A cepa 18, que apresentou halo de inibição foi identificada pelo teste de API 20E como *Enterococcus faecalis*.

Desmazeud & Roissart (1994) e Konemam *et al.* (1997) descrevem o gênero *Enterococcus* por serem geralmente encontrados como diplococos, anaeróbios facultativos, possuírem metabolismo homofermentativo (produz principalmente ácido láctico através da fermentação dos açúcares do meio), crescer em ambientes à temperaturas de 10 a 45 °C, em presença de 6,5% de NaCl, 40% de bile e por ser resistente a pH 9,6. Geralmente reagem negativamente a catalase, o que caracteriza a produção de peróxido de hidrogênio que pode auxiliar na inibição de patógenos como o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp* (REQUE, 1999).

## CONCLUSÃO

A cepa *Enterococcus Faecalis* é uma cepa homofermentativa, que produz preferencialmente ácido láctico a partir da glicose, é resistente a níveis de 5% de bile.

A cepa 18, isolada da cloaca do avestruz e identificada como *Enterococcus faecalis*, com incubação de 37°C/24 horas em caldo MRS apresenta capacidade de crescimento de  $3 \times 10^6$  UFC/mL e de produção de substâncias inibitórias frente à cepa *Staphylococcus aureus*. O fato de haver inibição nos testes *in vitro* demonstra que o fermentado tem propriedades necessárias para a sua utilização como prebiótico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE VUYST, L. *et al.* Antimicrobial potencial of probiotic on potentially probiotic lactic acid bacteria, the first results of the Internacional European Research Project PROPATH of the PROEUHEALTH, C. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v. 16, p. 125-130, 2004.

DESMAZEUD, M. J. & ROISSART, H. *Métabolism general dès bactéries láctiques*. In: *Bactéries Láctiques – Aspects fondamentaux et technologiques* v.1, p. 169 – 207. 1994.

FERREIRA, A. E. *Estudo de bacteriocinas produzidas por Enterococcus*. Porto Alegre, 2005. 126 p. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



GILLILAND *et al.* 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, v. 73, n. 4, p. 905-911.

KONEMAN, E. W. *et al.* *Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology*. 5 ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1997.

MAGNUSSON, J. Antifungal activity of lactic acid bacteria. 2003. 39 p. *Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences*. Uppsala, Sweden. – 2°.

REQUE, E. F. *Isolamento, identificação e estudos fisiológicos da bactéria de ação probiótica (Lactobacillus fermentum LPB) para uso em frangos de corte*. Curitiba, 1999, 96p. (Dissertação Mestrado em tecnologia química), Universidade Federal do Paraná.

SANTOS, J. R. G. GIL-TURNES, C. Probióticos em Avicultura. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n°3, p.741-749, 2005.

SILVA, S. V. *Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico*. 2007. 106p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTARE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotic and functional foods and their use in different disease. *Nutrition Research*, v.21, n.3, p. 569-579, 2001.