



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALTERAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE
FRANGOS DE CORTE PELA UTILIZAÇÃO
DE PROBIÓTICO NA ALIMENTAÇÃO

LUCIMARA DOS SANTOS CANALLI

Tese apresentada à Universidade Federal
do Paraná para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

CURITIBA

1992

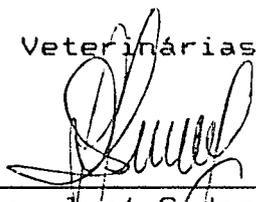
A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada, Aprova a Tese

ALTERAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE PELA
UTILIZAÇÃO DE PROBIOTICO NA ALIMENTAÇÃO

Elaborada por
LUCIMARA DOS SANTOS CANALLI

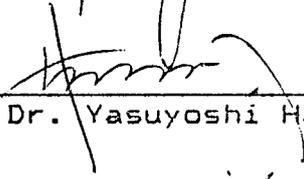
Como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias

Orientador:

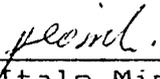


Prof. Dr. José Sidney Flemming

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Yasuyoshi Hayashi



Prof. Dr. Italo Minardi

Curitiba, 02 de outubro de 1992.

Ao meu marido
com amor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Sidney Flemming por sua dedicada orientação e acompanhamento desta pesquisa.

Ao Prof. José Francisco Ghignatti Warth pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por seu atencioso acompanhamento durante o curso de Pós-Graduação.

Ao Dr. Luimar Perly pela orientação inicial e pelo auxílio em todas as dificuldades.

A Prof^a. Maria José Dutra pelo auxílio prestado na fase inicial do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Sebastião Gonçalves Franco pelas sugestões e apoio durante a pesquisa.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti por permitir que a parte laboratorial do experimento fosse nele processada.

A Cooperativa Agrícola Consolata Ltda. por ceder as aves para a realização desta pesquisa.

A Sumitomo Corporation do Brasil S.A. - divisão agropecuária, pelo fornecimento do produto testado e do material de laboratório utilizados no presente trabalho.

A Mara Eliza Gasino Joineau pela inestimável colaboração durante o experimento.

A Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial ao Luiz Fernando Wolhke pelo estímulo e apoio constantes.

Ao João Gilberto Biora, do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da UFPr, pelo auxílio nos trabalhos com as aves.

Aos amigos do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti pela amizade e cooperação.

A Tânia Mara Schrank pela sua atenciosa dedicação para com todos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

A minha família pelo constante estímulo e amor; e ao meu marido pelo amor e apoio durante a execução deste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

ABREVIATURAS

AP - Agua peptonada

CBVBL 2% - Caldo bile verde brilhante lactose 2 %

CDME - Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti

Col. - coliformes

TSA - Tryptic soy agar

UFC - unidade formadora de colonia

BHI - Brain Heart Infusion

CONTEUDO

I	- INTRODUÇÃO.....	1
II	- MATERIAL E MÉTODOS.....	11
	2.1 - Local e Instalações.....	11
	2.2 - Animais.....	12
	2.3 - Alimentação.....	12
	2.4 - Tratamentos.....	17
	2.5 - Manejo.....	18
	2.6 - Amostragem.....	19
	2.7 - Análises Laboratoriais.....	19
	2.7.1 - Coliformes fecais.....	20
	2.7.2 - <i>Campylobacter jejuni</i>	21
	2.7.2.1 - Prova da Oxidase.....	23
	2.7.2.2 - Prova da Catalase.....	24
	2.7.2.3 - Prova de Sensibilidade ao Acido Nalidixico e à Cefalotina.....	24
	2.7.2.4 - Hidrólise do Hipurato.....	25
	2.7.2.5 - Prova do Cloreto de Sódio 3,5 % e do Tetrazolium 40 mcg/ml.....	25
	2.8 - Delineamento Experimental.....	26
III	- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
IV	- SUMARIO.....	42
V	- ABSTRACT.....	43
VI	- CONCLUSÕES.....	44
VII	- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46

I - INTRODUÇÃO

O estabelecimento de uma população microbiana, no trato digestivo dos animais de sangue quente, logo após o nascimento é inevitável.

A intensa atividade metabólica destes microrganismos pode ser um impacto substancial ao hospedeiro, pois competem com este por nutrientes da dieta, prejudicando o potencial de crescimento e produção dos animais domésticos.

Através destas observações conclui-se que a microbiota intestinal, dos frangos de corte e outros animais, tem um importante papel na digestão e absorção dos alimentos ingeridos pelo hospedeiro, exercendo desta forma, influência sobre sua saúde e produção.

O balanço da microbiota intestinal torna-se bastante instável frente a um fator de estresse como amontoamento, transporte, mudança alimentar repentina, frio ou calor excessivo. Nestas ocasiões as bactérias indesejáveis têm a oportunidade de prevalecer, o que leva a um decréscimo na eficiência alimentar e conseqüentemente na taxa de crescimento e produção.

Segundo VISEK (in MILES et al., 1989) a microbiota

intestinal diminui a absorção de nutrientes por aumentar a espessura da parede intestinal e a velocidade de passagem do bolo alimentar. MILES et al. (1989) relatam que os microrganismos intestinais também aumentam a necessidade de nutrientes pelo hospedeiro, por aumentarem a frequência de reposição da mucosa intestinal e por competirem com o hospedeiro por uma porção da proteína e energia da dieta.

Conforme pesquisa desenvolvida por GASAWAY (in MILES et al., 1989) 5 a 10 % da energia requerida pelo frango de corte é perdida através de ácidos graxos voláteis liberados na fermentação de componentes da dieta a nível intestinal.

Muitas bactérias da microbiota intestinal têm afinidade pelos aminoácidos livres no intestino delgado, decorrentes da digestão das proteínas da dieta, ocorrendo maior demanda principalmente de aminoácidos essenciais e limitantes. Entre outros fatores prejudiciais causados por certos tipos de bactérias, há a produção de cadaverina e aminas, que são irritantes da parede intestinal.

Visando superar os prejuízos causados por alguns microrganismos pertencentes à microbiota intestinal de frangos de corte, poderia se desenvolver estas criações em ambientes livres de germes. Isto não seria viável quanto ao aspecto econômico para se estabelecer e manter tais ambientes.

Outra alternativa para se controlar a microbiota intestinal, quanto ao tipo de microrganismos que a compõem, é o uso de antibióticos na ração.

Como estes controlam o crescimento e a proliferação de microrganismos, sob certas condições, baixas dosagens de

determinadas drogas têm provado serem efetivas como promotores de crescimento, desfavorecendo a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos ou que depreciam o potencial produtivo do hospedeiro (MARCH et al., in MILES et al., 1989).

MILES et al. (1989) observaram que o controle da população microbiana, com antibióticos na ração, resultou em características intestinais similares àquelas observadas em frangos livres de germes, ou seja, menor extensão e peso do trato intestinal, o que reduz o gasto energético. SZYLIT et al. (in MILES et al., 1989) constataram, em seus estudos, que as aves livres de germes, ou que recebem drogas promotoras de crescimento na ração utilizam melhor o nitrogênio e a energia do que as aves convencionais.

Há que se observar que animais criados, desde o nascimento, em ambientes livres de germes, não respondem ao uso de drogas antibacterianas na ração (MILES et al., 1989).

Apesar dos benefícios trazidos com o uso de antibiótico na ração de frangos de corte, há certos obstáculos quanto ao seu uso, como a seleção de bactérias resistentes, conforme observou OJENIYI (1989) em sua pesquisa, encontrando algumas cepas de *Escherichia coli* resistentes ao uso de tetraciclina, estreptomicina e sulfonamida. Um fator preocupante quanto ao uso deste tipo de promotor de crescimento é que os microrganismos que se tornam resistentes a estas drogas podem ser transmitidos a outros animais, ou dos animais ao ser humano, e neles desenvolver doenças de difícil terapia.

Dentre as bactérias que compõem a microbiota intestinal de frangos de corte, há as que produzem ácido láctico e com isto abaixam o pH intestinal, favorecendo portanto a produção dos frangos de corte, pois dificultam a colonização por *Escherichia coli*, a qual se desenvolve bem em pH neutro. Este ácido láctico, originário de uma hexose, representa uma fonte de energia prontamente utilizável pelo hospedeiro. Infelizmente as bactérias produtoras de ácido láctico são muito susceptíveis aos antibióticos utilizados na ração, segundo MULDER (1991), evidenciando um efeito negativo do uso de antibióticos como promotores de crescimento.

Para diminuir o uso de antibióticos na ração, os quais resultam em resistência bacteriana e em resíduos nos órgãos e tecidos das aves tratadas, probióticos começaram a ser introduzidos na alimentação animal.

Conforme menciona CHAPMAN (1988) os probióticos agem como promotores de crescimento, melhorando a produção e o estado geral de saúde dos animais, agindo por exclusão competitiva e por liberação de substâncias que desfavorecem a colonização por bactérias indesejáveis.

Um probiótico deve ser composto por uma ou mais bactérias que pertençam à microbiota intestinal normal, de curto tempo de regeneração, que produzam substâncias antimicrobianas e resistam aos processos de industrialização (CHAPMAN, 1988; FULLER, 1988; KOZASA, 1989; JONES, 1991; MULDER, 1991).

Conforme sumarizou, em extensa revisão, KOZASA (1989) o probiótico faz uma associação simbiótica benéfica com o

hospedeiro, promovendo crescimento, sendo estável no alimento e refratário aos agentes antimicrobianos da ração e do trato alimentar.

MULDER (1991) sugere a manutenção de uma microbiota intestinal estável com o uso de probióticos, o que serve como barreira contra microrganismos potencialmente patogênicos e propicia a obtenção de bons resultados zootécnicos.

Enfim, por reduzir a morbidade e mortalidade resultantes da colonização intestinal por organismos patogênicos, melhorar o crescimento e as características de produção sem deixar resíduos prejudiciais na carne, pois se trata de um procedimento totalmente natural, o uso de probióticos na alimentação animal tem sido indicado (CHAPMAN, 1988; FULLER, 1988).

É importante que se atente para o fato de que a promoção do crescimento, pelo uso de probiótico, ocorra somente se algum microrganismo depressor do crescimento estiver presente (FULLER, 1988). O mesmo se aplica aos antibióticos e outros produtos estimulantes do crescimento. Ligado a este fato, o efeito dos probióticos em frangos de corte apresenta-se variável (JERMIGAN et al., 1985, in JONES, 1991).

Os probióticos são geralmente compostos por um ou mais dos seguintes microrganismos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacteria*, *Bacillus* ou Leveduras (MULDER, 1991). Agem alterando a microbiota intestinal por exclusão competitiva e/ou através da produção de substâncias antimicrobianas ou que alterem o pH do meio.

Qualquer fator de estresse leva a uma alteração negativa da microbiota intestinal, elevando o número de coliformes e reduzindo o número de bactérias benéficas, principalmente as que produzem ácido lático, o qual desfavorece a colonização por *E. coli* (TORTUERO, 1973; WATKINS, 1982; CHAPMAN, 1988; JONES, 1991).

DWINGS et al. (1990) mencionam a observação de melhor eficiência alimentar e ganho de peso em frangos de corte que receberam um probiótico (*Streptococcus faecium* M-74) acrescido à ração do que aqueles frangos que receberam produtos antibacterianos adicionados à ração.

Desde que microrganismos do gênero *Bacillus* produzem várias substâncias antimicrobianas, o efeito da administração oral destas bactérias aos animais, ao invés da incorporação de antibióticos exógenos à ração, tem sido bastante vantajosa (OZAWA et al., 1979).

Além do *Bacillus* adicionado à ração de frangos de corte favorecer bons resultados zootécnicos, ficou evidenciado nos estudos de INOOKA et al. (1986) que o *Bacillus natto* também acarreta maior porcentagem de linfócitos T e B no baço, quando comparado com um grupo controle, o que sugere que tenha um efeito na resposta imune celular.

Como citado anteriormente, os probióticos mantêm uma microbiota intestinal estável, favorecendo a predominância de bactérias benéficas e dificultando a colonização por bactérias que não interessam à saúde e produção animal. Entretanto, no estudo de JIRAPHOCHAKUL et al. (1990), com fêmeas de peru não foi observado melhor peso corporal ou eficiência alimentar e

não houve influência na quantidade de *Lactobacillus* e *E. coli* no trato intestinal, com exceção dos cecos, quando receberam dietas acrescidas de *Bacillus subtilis*.

A fim de se verificar o efeito do uso de probiótico, composto por *Bacillus natto* cepa BN, na ração de frangos de corte e as possíveis alterações da microbiota intestinal, desenvolveu-se o presente trabalho de pesquisa. Buscou-se averiguar a possível redução de coliformes fecais e de *Campylobacter fetus* subspécie *jejuni* na microbiota intestinal.

O produto comercial utilizado neste experimento contém 10^9 *Bacillus natto* cepa BN por grama.

Há um grande interesse em se reduzir os coliformes fecais da microbiota intestinal de frangos de corte, visto que estes microrganismos competem de maneira substancial com o hospedeiro pelos nutrientes da dieta. Entretanto, a redução da quantidade de *Campylobacter jejuni* na microbiota intestinal dos frangos de corte está diretamente relacionada à saúde humana.

O *C. jejuni* é um microrganismo normalmente encontrado no trato intestinal das aves, sendo o frango de corte o principal veículo na transmissão de *C. jejuni* envolvendo enterite aguda em humanos (GRANT et al., 1980; CHAN et al., 1982; SOERJADI et al., 1982; MUNROE et al., 1983; OOSTEROM et al., 1983; FRICKER et al., 1984; ROGOL et al., 1985; STERN et al., 1985; BEUCHAT, 1986; HARRIS et al., 1986; BEERY et al., 1988; CABRITA et al., 1988; IZAT et al., 1988 a; IZAT et al., 1988 b).

BEERY et al. (1988) relataram em seus estudos que o número de *C. jejuni* no conteúdo intestinal de frangos de corte e perus está entre 10^4 e 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama, e averiguaram também que mais de 75 % destas aves abrigam *C. jejuni*.

CABRITA et al. (1988) mencionam uma taxa de isolamento de *C. jejuni* em 62 % das fezes de frangos de corte analisadas. GRANT et al. (1980) trabalhando com conteúdo retal de frangos de corte constatou que 83 % dos frangos examinados estavam infectados com *C. jejuni*. OOSTEROM et al. (1983) encontrou 92 % das aves processadas em abatedouros, contaminadas com *C. jejuni* no trato intestinal, especialmente nas porções mais baixas do intestino, como íleo, ceco e colo.

Apesar de uma pequena porcentagem de frangos de corte não abrigarem *C. jejuni* no trato intestinal, uma porcentagem ainda menor sai do abatedouro sem se contaminar durante o processamento.

Segundo o estudo realizado por PARK et al. (1981), onde foram analisadas 100 carcaças de aves, compradas em 20 estabelecimentos diferentes de Ontário (Canadá) e Ohio (E.U.A.), quanto a presença de *C. jejuni*, constatou-se 62 % e 54 % de amostras positivas, respectivamente.

Produtos de frango diferem de outros produtos animais porque a pele dos frangos de corte não é normalmente removida durante o processamento no abatedouro. Durante a remoção das vísceras, a bactéria *C. jejuni* pode ser transferida, acidentalmente, do intestino à superfície da pele, podendo ainda ocorrer uma contaminação cruzada entre as carcaças,

através da superfície dos equipamentos do abatedouro, principalmente na depenação, evisceração e resfriamento em imersão (MUNROE et al., 1983; OOSTEROM et al., 1983; ROGOL et al., 1985; YOGASUNDRAM et al., 1987; BEERY et al., 1988; IZAT et al., 1988 a).

A bactéria *C. jejuni* sobrevive bem em frangos refrigerados, onde pode permanecer viável por pelo menos um ano à temperatura de 18°C negativos (BEUCHAT, 1986).

DROMIGNY et al. (1985) relatam que a pele e o coração dos frangos de corte processados em abatedouros são localizações frequentes de *C. jejuni*. Este microrganismo foi encontrado em 85 % dos fígados e 89 % das moelas obtidos imediatamente após evisceração no abate dos frangos (CHRISTOPHER et al., 1982).

O fato de alguns lotes de frango de corte não abrigarem *C. jejuni* na sua microbiota intestinal, sugere que a infecção por este organismo pode e deve ser controlada por métodos de alimentação e manejo, que permitam evitar a exposição a aves portadoras, pois a transmissão é rápida e os frangos de corte jovens são altamente susceptíveis à *C. jejuni* (SOERJADI et al., 1982; MUNROE et al., 1983).

Nesta pesquisa, onde utilizou-se o probiótico composto por *Bacillus natto* cepa BN acrescido à ração, observou-se a variação da microbiota intestinal quanto ao número de coliformes fecais e de *C. jejuni*.

Para análise de *C. jejuni* o material fecal das aves foi cultivado em meio próprio, sob condições de microaerofilia por passivação do cobre (ATTEBERY et al., 1970 in MAGALHÃES et

al., 1982), e posteriormente analisado quanto as características de *Campylobacter fetus subspecie jejuni*, onde, entre outras provas, a que caracterizou esta espécie, diferenciando-a de outras *Campylobacter spp* foi a hidrólise do hipurato (HARVEY, 1980; HÉBERT et al., 1982; TERZOLO, 1988).

Para a análise de coliformes totais utilizou-se o material fecal diluído e cultivado em Caldo Bile Verde Brilhante Lactose 2 % e para a análise de coliformes fecais utilizou-se o caldo E.C., conforme a técnica utilizada por MEHLMAN (1983).

II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - LOCAL E INSTALAÇÕES

O experimento foi conduzido no Aviário Experimental do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no qual as aves foram alojadas em gaiolas confeccionadas em ferro e revestidas com zinco. Estas gaiolas possuem 50,00 cm de frente por 45,00 cm de profundidade e 53,00 cm de altura. São construídas com barras transversais de 0,50 cm de espessura e vão de 2,00 cm. A face superior é fixada com dobradiças, representando a porta da gaiola. Nas paredes frontais, barras fixas são intercaladas com barras móveis, as quais podem ser suspensas e permitir o acesso da cabeça da ave ao comedouro e ao bebedouro definitivos, colocados externamente à gaiola e em faces opostas.

O aviário experimental, que contém as gaiolas apoiadas sobre cavaletes de madeira, apresenta 4,70 m de largura por 10,30 m de comprimento e 2,70 m de altura. A ventilação se faz naturalmente através de quatro janelas.

O conteúdo intestinal coletado das aves abatidas aos 28 e 47 dias de idade foi analisado no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.

2.2 - ANIMAIS

As aves utilizadas para este experimento foram frangos de corte machos, da linhagem ARBOR ACRES, adquiridos à idade de 1 dia, com peso médio de 42,00 g, provenientes do Incubatório da Cooperativa Agrícola Consolata Ltda., situado à cidade de Nova Aurora - Pr.

Foram alojados 48 pintainhos em 16 gaiolas, sendo distribuídos 3 pintainhos ao acaso por gaiola.

2.3 - ALIMENTAÇÃO

As rações utilizadas constituíam-se basicamente por uma mistura de farelo de torta de soja e milho, suplementada com vitaminas e minerais.

Os níveis nutricionais da ração variaram de acordo com a fase de desenvolvimento das aves (ANDRIGUETTO et al., 1989):

a - Ração inicial ou primeira fase - administrada de 1 dia até 21 dias de idade.

b - Ração crescimento ou segunda fase - administrada de 22 a 40 dias de idade.

c - Ração acabamento ou terceira fase - administrada de 41 a 47 dias de idade.

Os componentes utilizados na dieta e seus respectivos valores nutricionais e quantitativos encontram-se nas tabelas I, II, III, IV, V, VI.

TABELA I
COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO INICIAL (1 - 21 DIAS DE IDADE)

INGREDIENTES	Kg
Milho moído	604,4
Farelo de soja	326,0
Farinha de carne	26,0
Farinha de penas, vísceras e resíduos de abatedouro	15,0
Calcário calcítico	9,0
Fosfato bicálcico	6,0
Oleo de vísceras	5,0
Cloreto de sódio	3,0
DL Metionina	1,0
Vitaminas *	1,0
Cloreto de colina	0,5
Minerais * *	1,0
Antioxidante	0,1
Coccidicida	1,0
Premix do Probiótico * * *	1,0
Total	1.000,0

* Suplementação de vitaminas por Kg de ração: vit. A 15.000 UI; vit. D₃ 2.000 UI; vit. E 30,00 mg; vit. K₃ 3,00 mg; vit. B₁ 3,00 mg; vit. B₂ 8,00 mg; vit. B₆ 7,00 mg; vit. B₁₂ 30,00 mcg; Niacina 50,00 mg; Acido Pantotênico 20,00 mg; Acido Fólico 1,50 mg; Biotina 0,17 mg; Colina 800,00 mg.

* * Suplementação de minerais por Kg de ração: Ferro 30,00 mg; Zinco 50,00 mg; Cobre 10,00 mg; Iodo 0,40 mg; Manganês 70,00 mg; Selênio 0,10 mg; Cobalto 0,25 mg.

* * * Premix do Probiótico: adição de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 g do probiótico *Bacillus natto*, por tonelada de ração, conforme o tratamento (A, B, C ou D), utilizando como veículo milho moído em quantidade suficiente para 1,00 Kg.

TABELA II
COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO CRESCIMENTO (22 - 40 DIAS DE IDADE)

INGREDIENTES	Kg
Milho moído	343,9
Farelo de soja	278,0
Farinha de carne	40,0
Farinha de penas, vísceras e resíduos de abatedouro	18,0
Calcário calcítico	5,0
Fosfato bicálcico	2,0
Oleo de vísceras	5,0
Cloreto de sódio	3,0
DL Metionina	1,0
Vitaminas *	1,0
Cloreto de colina	0,5
Minerais * *	1,0
Antioxidante	0,1
Coccidiostático	0,5
Premix do Probiótico * * *	1,0
Total	1.000,0

* Suplementação de vitaminas por Kg de ração: vit. A 15000 UI; vit D₃ 2.000 UI; vit E 30,00 mg; vit. K₃ 3,00 mg; vit. B₁ 3,00 mg; vit. B₂ 8,00 mg; vit. B₆ 7,00 mg; vit. B₁₂ 30,00 mcg; Niacina 50,00 mg; Acido Pantotênico 20,00 mg; Acido Fólico 1,50 mg; Biotina 0,17 mg; Colina 800,00 mg.

* * Suplementação de minerais por Kg de ração: Ferro 30,00 mg; Zinco 50,00 mg; Cobre 10,00 mg; Iodo 0,40 mg; Manganês 70,00 mg; Selênio 0,10 mg; Cobalto 0,25 mg.

* * * Premix do Probiótico: adição de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 gramas do probiótico *Bacillus natto* por tonelada de ração, conforme o tratamento (A, B, C ou D), utilizando como veículo milho moído em quantidade suficiente para 1,00 Kg.

TABELA III
COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO ACABAMENTO (41 - 47 DIAS DE IDADE)

INGREDIENTES	Kg
Milho moído	683,4
Farelo de soja	240,0
Farinha de carne	46,0
Farinha de penas, vísceras e resíduos de abatedouro	12,0
Calcário calcítico	5,0
Oleo de vísceras	5,0
Cloreto de sódio	3,0
DL Metionina	1,0
Vitaminas *	1,0
Cloreto de colina	0,5
Minerais * *	1,0
Antioxidante	0,1
Coccidiostático	1,0
Premix do Probiótico * * *	1,0
Total	1.000,0

* Suplementação de vitaminas por Kg de ração: vit. A 15.000 UI; vit. D₃ 2.000 UI; vit. E 30,00 mg; vit. K₃ 3,00 mg; vit. B₁ 3,00 mg; vit. B₂ 8,00 mg; vit. B₆ 7,00 mg; vit. B₁₂ 30,00 mcg; Niacina 50,00 mg; Acido Pantotênico 20,00 mg; Acido Fólico 1,50 mg; Biotina 0,17 mg; Colina 800,00 mg.

* * Suplementação de minerais por Kg de ração: Ferro 30,00 mg; Zinco 50,00 mg; Cobre 10,00 mg; Iodo 0,40 mg; Manganês 70,00 mg; Selênio 0,10 mg; Cobalto 0,25 mg.

* * * Premix do Probiótico: adição de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 gramas do probiótico *Bacillus natto* por tonelada de ração, conforme o tratamento (A, B, C ou D), utilizando como veículo milho moído em quantidade suficiente para 1,00 Kg.

TABELA IV
ANALISE CALCULADA DA RAÇÃO INICIAL (1 - 21 DIAS)

Nutrientes	
Energia metabolizável	2947 Kcal/Kg
Proteína bruta	21,75 %
Extrato etéreo	3,82 %
Fibra bruta	3,57 %
Resíduo mineral	5,53 %
Cálcio	0,98 %
Fósforo útil	0,44 %
Fósforo total	0,67 %
Metionina + Cistina	0,88 %
Lisina	1,17 %
Arginina	1,65 %
Triptofano	0,24 %
Treonina	0,91 %
Glicina	1,06 %

TABELA V
ANALISE CALCULADA DA RAÇÃO CRESCIMENTO (22 - 40 DIAS)

NUTRIENTES	
Energia metabolizável	3005 Kcal/Kg
Proteína bruta	20,65 %
Extrato etéreo	4,08 %
Fibra bruta	3,42 %
Resíduo mineral	5,22 %
Cálcio	0,94 %
Fósforo útil	0,45 %
Fósforo total	0,67 %
Metionina + Cistina	0,85 %
Lisina	1,08 %
Arginina	1,65 %
Triptofana	0,24 %
Treonina	0,91 %
Glicina	1,06 %

TABELA VI
ANALISE CALCULADA DA RAÇÃO ACABAMENTO (41 - 47 DIAS)

NUTRIENTES	
Energia metabolizável	3048 Kcal/Kg
Proteína bruta	19,00 %
Extrato etéreo	4,16 %
Fibra bruta	3,29 %
Resíduo mineral	5,02 %
Cálcio	0,94 %
Fósforo útil	0,43 %
Fósforo total	0,64 %
Metionina + Cistina	0,79 %
Lisina	0,98 %
Arginina	1,40 %
Triptofano	0,20 %
Treonina	0,78 %
Glicina	1,03 %

2.4 - TRATAMENTOS

Para avaliar a eficiência do probiótico em estudo (*Bacillus natto* cepa BN) foram testados diferentes níveis do mesmo na ração:

Tratamento A - Ração básica sem adição do probiótico (testemunha).

Tratamento B - Ração básica acrescida de 100,00 g * do probiótico por tonelada de ração.

Tratamento C - Ração básica acrescida de 75,00 g * do probiótico por tonelada de ração.

Tratamento D - Ração básica acrescida de 50,00 g * do probiótico por tonelada de ração.

Cada grama do probiótico contém 10^9 *Bacillus natto* cepa BN.

2.5 - MANEJO

As 48 aves utilizadas para o experimento foram distribuídas em 16 gaiolas, sendo escolhidas ao acaso 3 aves por gaiola. Os tratamentos A, B, C e D foram sorteados entre as gaiolas de forma que cada tratamento fosse distribuído a 4 gaiolas, portanto 4 repetições por tratamento.

Os pisos das gaiolas, tipo gaveta de metal, foram forrados com maravalha de pinho. Até os sete dias de idade das aves utilizou-se comedouro inicial do tipo copo, e bebedouro inicial do tipo garrafa, com capacidade para 450,00 g de ração e 350,00 ml de água respectivamente, colocados no piso das gaiolas na proporção de 1 bebedouro e 1 comedouro por gaiola. A partir dos sete dias de idade comedouros e bebedouros definitivos, tipo calha de PVC, começaram a ser utilizados, sendo distribuídos na proporção de 1 comedouro e 1 bebedouro por gaiola, colocados externamente à esta. Para adaptação das aves a mudança de comedouros e bebedouros iniciais para definitivos se deu de forma gradual entre os 7 e 10 dias de idade.

Água e ração foram fornecidas à vontade aos animais. Até 21 dias de idade as aves receberam ração inicial, passando à ração crescimento de 22 até 40 dias de idade e ração acabamento dos 41 aos 47 dias de idade.

Foram empregadas, como fonte de calor, lâmpadas incandescentes de 60 Watts, de altura regulável, sendo 1 para cada gaiola. A temperatura durante os primeiros 3 dias

manteve-se em torno de 35^o C, sofrendo redução de cerca de 3 a 5^o C por semana até as aves completarem 4 semanas de idade, quando as lâmpadas incandescentes foram desligadas e prosseguiu-se o experimento com as aves à temperatura ambiente.

2.6 - AMOSTRAGEM

Retirou-se 1 ave, ao acaso, de cada gaiola, totalizando 16 aves, 4 de cada tratamento, aos 28 e aos 47 dias de idade.

Acondicionadas em caixas de papelão, devidamente identificadas conforme o tratamento, as aves foram levadas ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME), onde sofreram abate através da desarticulação das vértebras cervicais.

A necrópsia coletou-se os conteúdos da porção final do intestino delgado e dos cecos, colocados em papel alumínio separados e identificados conforme o tratamento.

Pesou-se 1 g de cada um dos materiais das amostras para se proceder as análises laboratoriais e para estas análises também foi levada mais uma porção de conteúdo dos cecos sem pesar.

2.7 - ANÁLISES LABORATORIAIS

No Departamento de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, as amostras do conteúdo da porção final do intestino delgado foram utilizadas para análise da

colonização por coliformes fecais frente aos diferentes tratamentos, e as amostras do conteúdo dos cecos foram analisadas quanto a colonização por *C. jejuni* frente aos diferentes tratamentos.

2.7.1 - COLIFORMES FECAIS

Para a análise de coliformes fecais utilizou-se o conteúdo da porção final do intestino delgado dos frangos, o qual normalmente contém entre 10^6 e 10^8 coliformes por grama.

Foi diluída 1 g desta amostra em 9 ml de Água Peptonada (AP) pH 7,0, constituindo uma diluição 10^{-1} . Com 1 ml desta diluição realizou-se nova diluição em 9 ml de AP, tendo-se, desta forma, diluições sucessivas até atingir a diluição de 10^{-7} .

Tubos de ensaio (15 X 150 mm) contendo, cada um, 1 tubo de Duran e 9 ml de Caldo Bile Verde Brilhante Lactose 2 % (CBVBL 2 %), foram utilizados para se observar a presença e estimar o número de coliformes totais nas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Estas diluições foram obtidas passando-se 1 ml de cada uma das diluições, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} em AP, para diferentes tubos de ensaio (15 X 150 mm) contendo 1 tubo de Duran e 9 ml de CBVBL 2 %. Para cada diluição utilizou-se 3 tubos de ensaio contendo CBVBL 2 %, totalizando 9 tubos de ensaio, a serem incubados à 37° C por 48 horas, por amostra.

Após este período fez-se a leitura, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram formação de gás no interior do tubo de Duran. Com este resultado obteve-se

a análise dos coliformes totais. Depois da leitura repicou-se o material dos tubos de ensaio, contendo CBVBL 2 %, que se apresentaram positivos para coliformes totais, para tubos de ensaio (15 X 150 mm) contendo, cada um, 1 tubo de Duran e 9 ml de Caldo E.C., específico para coliformes fecais. Estes tubos foram incubados em banho-maria à temperatura de 44,5° C durante 48 horas. O resultado desta leitura foi considerado positivo quando houve produção de gás no interior do tubo de Duran, obtendo-se, desta forma, a análise de coliformes fecais.

2.7.2 - *Campylobacter jejuni*

Para o isolamento e contagem de *C. jejuni* utilizou-se o conteúdo dos cecos dos frangos, o qual normalmente apresenta entre 10^4 e 10^8 unidades formadoras de colônia por grama.

Uma grama do conteúdo dos cecos foi diluída em AP pH 7,0 até 10^{-5} . Das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} tentou-se isolar *C. jejuni* em placas de Petri com meio Tryptic Soy Agar (TSA) acrescido de 6 % de sangue desfibrinado de carneiro e uma solução de antimicrobianos. Cada 10 ml desta solução de antimicrobianos é composta de 10 mg de Vancomicina, 5 mg de Trimetoprim, 2500 UI de Polimixina B, 2 mg de Anfotericina B e 15 mg de Cefalotina. Para cada litro e meio de TSA foi adicionada esta quantidade de antimicrobianos.

Para cada diluição (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) utilizou-se 2 placas de Petri (20 X 100 mm) contendo 20 ml de TSA. Em cada

placa semeou-se 0,1 ml das determinadas diluições. Com o auxílio de uma alça de Trigalski o material foi espalhado na superfície do meio TSA. O conteúdo do ceco sem ser diluído também foi semeado em uma placa com TSA. Estas placas, 7 por amostra, foram então incubadas em condições de microaerofilia a 42^oC por 72 horas.

As placas de Petri com o meio de TSA e semeadas com as amostras, foram incubadas no interior de potes plásticos com tampa. Para a obtenção de microaerofilia utilizou-se o método da lâ de aço, descrito por ATTEBERY et al. (1970) e citado por MAGALHÃES et al. (1982). Neste método, para cada 1500 ml de capacidade do pote plástico, 4 a 5 gramas de lâ de aço foram imersas em 10 ml de solução de sulfato de cobre contidos numa placa de Petri, que posteriormente foi tampada, invertida e colocada no fundo do pote plástico. Em seguida foram colocadas as placas de Petri com o referido meio de cultura devidamente semeado. Acima destas placas de Petri colocou-se 0,5 Alka-Seltzer (1,8 g) acondicionado em uma tampa de placa de Petri. Logo em seguida o pote foi fechado e, para melhor vedação da tampa com o pote, passou-se fita crepe ao redor do ponto de encaixe dos mesmos.

No processo de microaerofilia, promovido pelo uso da lâ de aço e a solução de sulfato de cobre, ocorre uma depleção do oxigênio e formação de vapor de água, que age no Alka-Seltzer e libera dióxido de carbono.

Com essas substâncias, utilizadas nas proporções acima citadas, ocorre uma redução do oxigênio e um aumento do dióxido de carbono, caracterizando um ambiente microaerófilo.

TABELA VII
Alka-Seltzer (Antiácido, Analgésico)

Cada comprimido contém:	
Acido acetilsalicílico	0,324 g
Bicarbonato de sódio	1,912 g
Acido cítrico	1,328 g

Fonte: Miles do Brasil Ltda.

A leitura selecionou-se as placas que apresentaram colônias características do gênero *Campylobacter*, ou seja, punctiformes e brilhantes ou espreiadas em véu.

Com o material destas colônias fez-se uma série de provas laboratoriais a fim de se verificar se reagiam como *C. jejuni*. As bactérias, das colônias suspeitas, que se apresentaram GRAM negativas, espiraladas ou em forma de vírgula, oxidase positivas, catalase positivas, sensíveis ao ácido nalidíxico, resistentes à cefalotina, que hidrolisaram o hipurato de sódio, cresceram em meio de cultura contendo Tetrazolium à concentração de 40 mcg / ml e não cresceram em meio de cultura contendo 3,5 % de cloreto de sódio (NaCl), se enquadraram como *Campylobacter jejuni*.

2.7.2.1 - Prova da Oxidase

Realizou-se esta prova passando-se uma pipeta de Pasteur, com cultura suspeita de uma amostra, sobre uma tira de papel filtro embebida em solução aquosa de cloridrato de dimetilparafenilenodiamina a 1 % . A leitura, 5 a 10 segundos após, o material oxidase positivo apresentou-se escuro.

2.7.2.2 - Prova da Catalase

Em uma lâmina, com auxílio de uma alça de Kolle, misturou-se o material da colônia suspeita a uma gota de solução fisiológica. Em seguida adicionou-se a esta mistura uma gota de água oxigenada a 3 % . A leitura revelou-se catalase positivo o material que apresentou produção de bolhas pela ação da enzima catalase, que transforma a água oxigenada em água e oxigênio.

2.7.2.3 - Prova de Sensibilidade ao Acido Nalidíxico e à Cefalotina

Repicou-se a colônia suspeita, do meio de cultura TSA, em tubo de ensaio contendo 3 ml de Brain Heart Infusion (BHI), o qual foi incubado, em condições de microaerofilia, à temperatura de 37⁰ C durante 24 horas.

Após este período, com o auxílio de um swab, semeou-se este material em uma placa de Petri (20 X 100 mm) com o meio de TSA. Em seguida, foram colocados nesta placa, em pontos equidistantes, 2 discos de concentração única de 30 mcg, um contendo cefalotina e o outro ácido nalidíxico. Estas placas foram incubadas à 37⁰ C durante 24 horas. A leitura o material suspeito que apresentou sensibilidade ao ácido nalidíxico, formando um halo maior ou igual a 19 mm em torno do disco correspondente, e resistência à cefalotina, formando um halo de no máximo 14 mm ao redor do disco de cefalotina, reagiu como *C. jejuni*.

2.7.2.4 - Hidrólise do Hipurato

Através da enzima hipurase a *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o ácido hipúrico, transformando-o em benzoato de sódio e glicina. Para se constatar esta reação, repicou-se, com a alça de Kolle, uma porção abundante da colônia suspeita num tubo de ensaio contendo 0,4 ml de hipurato de sódio a 1%, que foi então incubado em banho-maria a 37^o C durante 2 horas.

Após este período de incubação adicionou-se 0,5 ml de solução de ninhydrina (3,5 g de ninhydrina em 100 ml de uma mistura 1:1 de acetona e butanol) e agitou-se o tubo de ensaio, que retornou ao banho-maria a 37^o C por mais 10 minutos. Posteriormente permaneceu 2 horas à temperatura ambiente antes da leitura, que considerou positivas as amostras que mostraram cor púrpura intensa pela reação da ninhydrina com a glicina.

2.7.2.5 - Prova do Cloreto de Sódio 3,5 % e do Tetrazolium 40 mcg/ml

Para realizar estas provas, tubos de ensaio com rosca (16 X 160 mm), contendo, cada um, 10 ml do meio semi-sólido de Albimi, foram fervidos em banho-maria, com as roscas semi abertas, durante 15 minutos. Após esfriá-los bruscamente acrescentou-se 3,5 % de cloreto de sódio nos tubos para esta prova bioquímica, e acrescentou-se 40 mcg de tetrazolium para cada mililitro do meio de Albimi nos tubos destinados a esta prova.

O material das colônias suspeitas foi então repicado em cada um destes meios. Estes tubos foram incubados, com a rosca fechada, à temperatura de 37^o C durante 5 dias.

A leitura foi feita todos os 5 dias, sendo caracterizados nos padrões de crescimento da *C. jejuni* os tubos com meio de Albimi contendo 3,5 % de NaCl que não apresentaram crescimento, e os tubos com meio de Albimi contendo tetrazolium na proporção de 40 mcg / ml que apresentaram crescimento.

2.8 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizou-se um delineamento experimental completamente casualizado (DCC), sendo 4 tratamentos, com 4 repetições por tratamento.

Para a contagem do crescimento microbiano utilizou-se o sistema de contagem padrão em placas para a análise de *C. jejuni* e o sistema do número mais provável (NMP) para a análise de coliformes fecais.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste experimento refletem o efeito benéfico do uso do probiótico *Bacillus natto* cepa BN quanto a alteração da proporção dos microrganismos componentes da microbiota intestinal.

A simbiose entre os componentes da microbiota intestinal e seu hospedeiro é um aspecto relevante aos fatores de saúde, crescimento e produção dos animais domésticos.

Através da exclusão competitiva dos microrganismos indesejáveis na microbiota intestinal e/ou produção de substâncias antimicrobianas ou que dificultem a colonização destes a nível intestinal, o uso dos probióticos acrescidos à ração animal tem provado eficiente promoção da higidez e do crescimento dos frangos de corte.

De acordo com JONES (1991), os resultados da administração de probiótico na alimentação são freqüentemente variáveis. Pois segundo FULLER (1988) a promoção do crescimento, com a adição de probiótico à ração, só ocorrerá se um ou mais microrganismos depressores do crescimento estiverem presentes.

No experimento de JIRAPHOCHAKUL et al. (1990) a administração de probiótico composto por *Bacillus subtilis* a perus não influenciou a quantidade de *Lactobacillus* ou

Escherichia coli no trato intestinal, com exceção dos cecos, que apresentaram maior quantidade de *B. subtilis*.

Há relatos, segundo JIRAPHOCHAKUL et al. (1990), que cultura de *Bacillus subtilis*, quando administrada a perus, favorece um aumento no número de *Lactobacillus*, os quais, por sua vez, devem evitar a proliferação excessiva de microrganismos entéricos indesejáveis, tal como a *Escherichia coli*. O aumento do número dos *Lactobacillus* promove o ganho de peso e reduz a mortalidade segundo CHAPMAN (1988). É conveniente lembrar que o *Bacillus natto* provém de uma cepa de *Bacillus subtilis*.

Os resultados deste experimento concordam com os dados encontrados na bibliografia, onde fica favorecido o estabelecimento de uma microbiota eutrófica com o uso de probiótico acrescido à ração. Constatou-se nesta pesquisa o efeito do *B. natto* em reduzir o número de coliformes fecais.

Sendo o *Bacillus natto* proveniente de uma cepa do *Bacillus subtilis*, pode-se esperar que surta efeito semelhante quando do seu uso. Segundo POLLMANN (1986), o uso de *B. subtilis* em dietas de matrizes de suínos reduziu, de forma significativa, o número de leitões desmamados que sucumbem por enterite causada por *Escherichia coli*.

Tendo-se em vista que os componentes da microbiota intestinal influem diretamente na nutrição do hospedeiro, afetam o tempo de trânsito do quimo nas alças intestinais, favorecem ou desfavorecem o estabelecimento de outros microrganismos, e ainda podem causar doenças, qualquer procedimento que vise a redução dos microrganismos

indesejáveis desta microbiota será de interesse à saúde e produção do hospedeiro.

Nesta pesquisa o efeito competitivo do *B. natto* mostrou-se evidenciado nos resultados de contagem de coliformes fecais dos frangos com 47 dias de idade. Este efeito diminui à medida que decresce a dosagem do probiótico utilizada por tonelada de ração, sendo a dosagem mais efetiva a de 100,00 g do probiótico *Bacillus natto* por tonelada de ração.

Aos 28 dias de idade os resultados da contagem de coliformes fecais apresentaram-se não conclusivos, devido ao fato dos frangos de corte jovens não possuírem uma microbiota intestinal mais estável e definida (SOERJADI et al., 1982). Já aos 47 dias de idade dos frangos, diluiu-se a amostra até 10^{-9} a fim de se elucidar melhor a diferença entre os tratamentos. Aos 47 dias dos frangos, na análise dos tratamentos com 50,00 ou 75,00 g do probiótico *Bacillus natto* por tonelada de ração, apenas 25 % das amostras apresentaram, 10^8 coliformes fecais por grama de conteúdo fecal da porção final do intestino delgado, através de análise do número mais provável (NMP). Nestes dois tratamentos 75 % das amostras apresentaram 10^9 ou mais coliformes fecais por grama do mesmo material.

Ainda aos 47 dias, no tratamento que utilizou 100,00 g do probiótico *Bacillus natto* por tonelada de ração, 25 % das amostras apresentaram somente 10^7 coliformes fecais por grama de conteúdo fecal da porção final do intestino delgado e 75 % das amostras apresentaram 10^9 coliformes fecais por grama do

mesmo material.

No tratamento que não utilizou o probiótico (testemunha) 100 % das amostras apresentaram 10^9 coliformes fecais por grama da amostra.

Estas porcentagens podem não parecer significativas num número pequeno de frangos, mas extrapolando-se às grandes produções avícolas refletirão grandes diferenças produtivas (Tabela VIII e Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

A análise da redução do número de *Campylobacter jejuni* no trato intestinal de frangos de corte não foi possível efetuar, devido ao não estabelecimento deste microrganismo nas aves criadas em gaiolas, conforme cita GENIGEORGIS (1987). Entre os parâmetros, que podem alterar a introdução e disseminação deste microrganismo num lote, estão o número de vezes que foi utilizada a cama onde será alojado o lote, a presença ou ausência de *C. jejuni* no último lote abrigado no galpão, estresse ambiental, moscas, cães, gatos, roedores e transmissão através de fômites pelos empregados.

A amostra que foi utilizada para se tentar o isolamento e a contagem de *C. jejuni* foi o conteúdo fecal dos cecos. Este material normalmente apresenta, em frangos de corte criados de maneira convencional em piso, uma taxa relativamente elevada de *C. jejuni*, ou seja, 10^4 a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) / g (BEERY et al., 1988). Por este motivo e pelo material poder ser semeado em tempo menor do que 6 horas após necrópsia, não se procedeu inoculação em meio de enriquecimento, o que alguns autores indicam (SOERJADI et al., 1982; FRICKER, 1984; FRANCO, 1988).

TABELA VIII
Crescimento de Coliformes Fecais em Diferentes Diluições Decimais

Tratamento		28 DIAS						47 DIAS					
		Verde Brilhante			Caldo EC			Verde Brilhante			Caldo EC		
		-6	-7	-8	-6	-7	-8	-7	-8	-9	-7	-8	-9
A	A1	++-	++-	---	++-	++-	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	A2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	A3	++-	---	---	++-	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	A4	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	++-	++-	++-
B	B1	+++	+++	++-	+++	+++	++-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	B2	++-	---	---	++-	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	++-
	B3	+++	+++	++-	+++	+++	++-	+++	+++	++-	++-	++-	++-
	B4	+++	+++	+++	+++	+++	++-	+++	+++	+++	++-	---	---
C	C1	++-	---	---	++-	---	---	+++	++-	---	++-	++-	---
	C2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++-	++-	+++
	C3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	C4	+++	+++	++-	+++	+++	++-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D	D1	+++	++-	++-	+++	++-	++-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	D2	+++	+++	++-	+++	++-	++-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	D3	+++	++-	---	+++	++-	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	D4	---	---	---	---	---	---	+++	++-	---	+++	++-	---

Sistema : A amostra (1 g de conteúdo fecal da porção final do intestino delgado) foi diluída em água peptonada até 10^{-7} . Para cada uma das diluições, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , utilizou-se 3 tubos de ensaio (15 X 150 mm) contendo cada um 9 ml de Caldo Bile Verde Brilhante Lactose 2 % e um tubo de Duran. Foi inoculado 1 ml da diluição 10^{-5} em cada um dos 3 tubos de ensaio, repetindo-se o procedimento para as outras diluições em outros tubos de ensaio. Este material novamente diluído, agora em CBVBL 2 % foi incubado a 37° durante 48 horas. Após este período o material dos tubos positivos foi repicado para tubos de ensaio (15 X 150 mm) contendo cada um 9 ml de Caldo E.C. e um tubo de Duran. Este material foi incubado em banho-maria à temperatura de $44,5^{\circ}$ C durante 48 horas. Os tratamentos A, B, C e D foram constituídos pela ração acrescida de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 gramas do probiótico por tonelada.

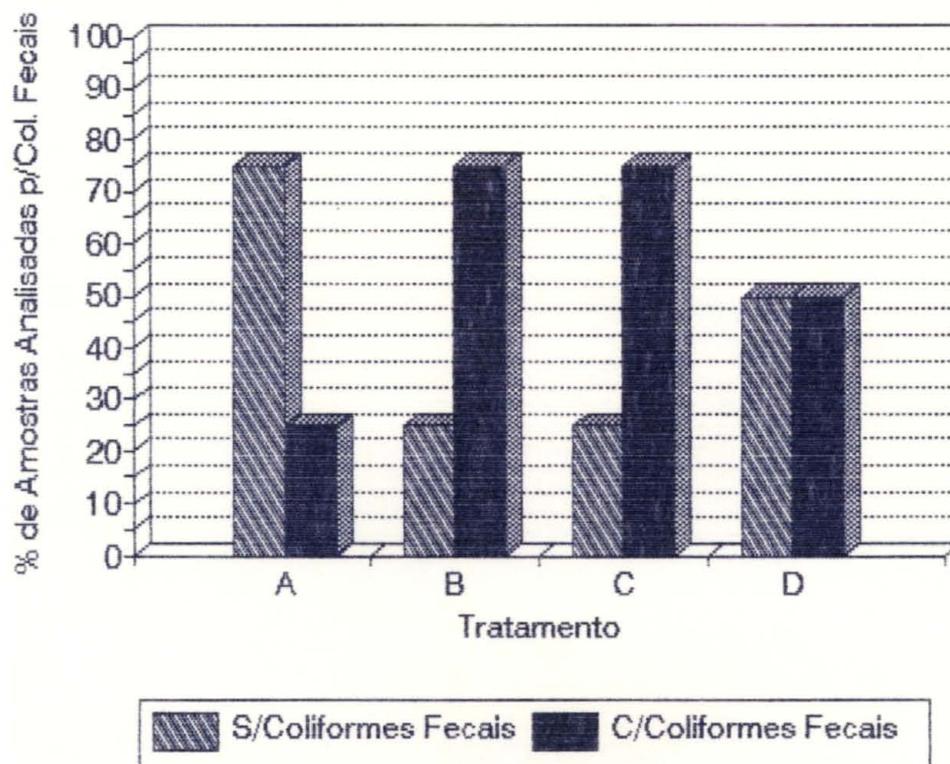


Figura 1: Porcentagem de amostras de conteúdo intestinal de frangos de corte, aos 28 dias de idade, positivas/negativas para coliformes fecais, na diluição 10^{-8} , cultivadas em Caldo E.C. a $44,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria durante 48 horas. Previamente estas amostras foram diluídas em AP, semeadas em CBVBL 2 % e cultivadas a 37°C durante 48 horas, resultando na análise de coliformes totais. Os tratamentos A, B, C e D foram constituídos pela ração acrescida de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 gramas do probiótico, contendo 10^9 *Bacillus natto* por grama, por tonelada de ração, respectivamente.

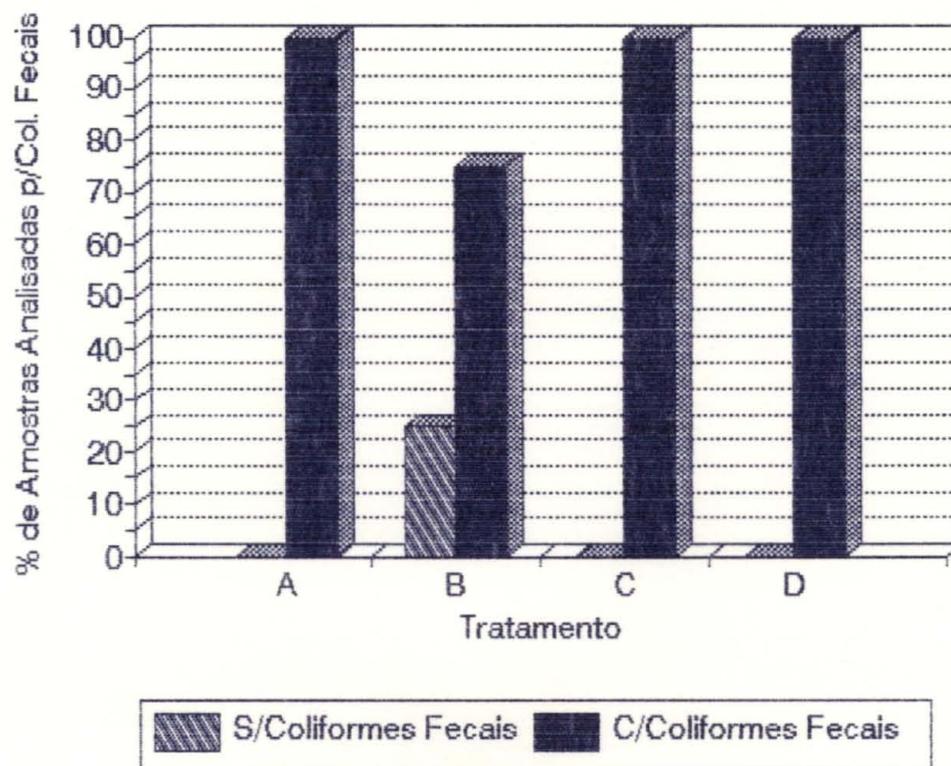


Figura 2: Porcentagem de amostras de conteúdo intestinal de frangos de corte, aos 47 dias de idade, positivas/negativas para coliformes fecais, na diluição 10^{-8} , cultivadas em Caldo E.C. a $44,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria durante 48 horas. Previamente estas amostras foram diluídas em AP, semeadas em CBVBL 2 % e cultivadas a 37°C durante 48 horas, resultando na análise de coliformes totais. Os tratamentos A, B, C e D foram constituídos pela ração acrescida de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 gramas do probiótico, contendo 10^9 *Bacillus natto* por grama, por tonelada de ração, respectivamente.

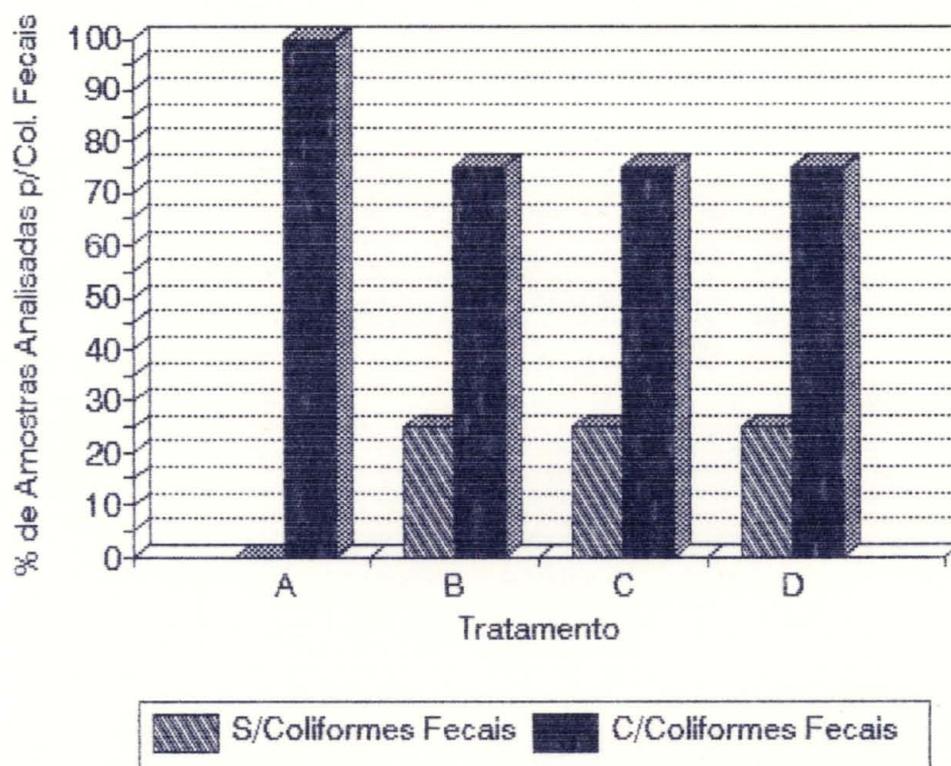


Figura 3: Porcentagem de amostras de conteúdo intestinal de frangos de corte, aos 47 dias de idade, positivas/negativas para coliformes fecais, na diluição 10^{-9} , cultivadas em Caldo E.C. a $44,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria durante 48 horas. Previamente estas amostras foram diluídas em AP, semeadas em CBVBL 2 % e cultivadas a 37°C durante 48 horas, resultando na análise de coliformes totais. Os tratamentos A, B, C e D foram constituídos pela ração acrescida de 0,00 ; 100,00 ; 75,00 e 50,00 gramas do probiótico, contendo 10^9 *Bacillus natto* por grama, por tonelada de ração, respectivamente.

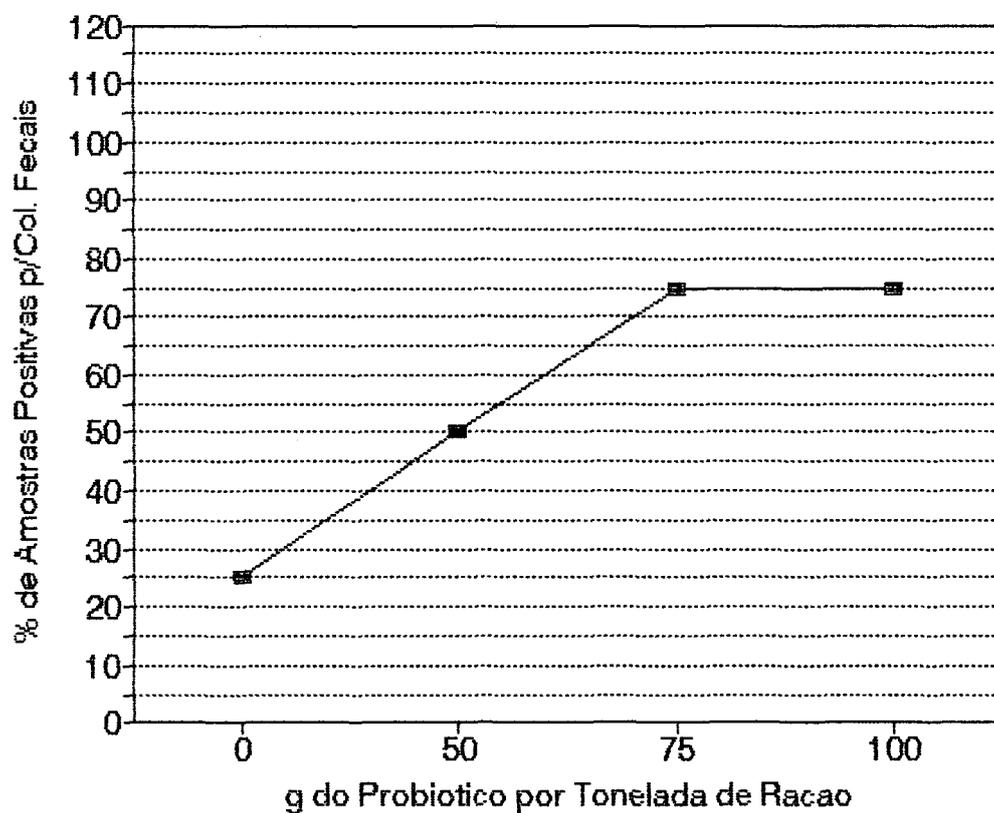


Figura 4: Porcentagem de amostras de conteúdo intestinal de frangos de corte, aos 28 dias de idade, positivas para coliformes fecais, na diluição 10^{-8} , cultivadas em Caldo E.C. a $44,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria durante 48 horas. Previamente estas amostras foram diluídas em AP, semeadas em CBVBL 2 % e cultivadas a 37°C durante 48 horas, resultando na análise de coliformes totais.

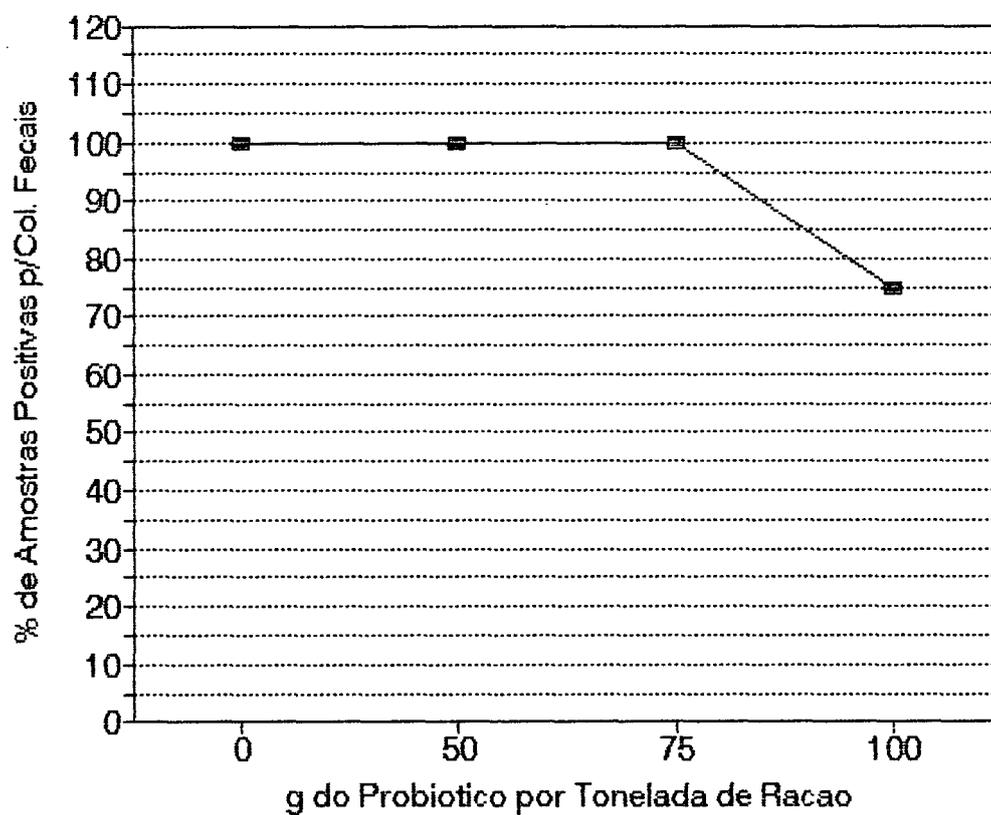


Figura 5: Porcentagem de amostras de conteúdo intestinal de frangos de corte, aos 47 dias de idade, positivas para coliformes fecais, na diluição 10^{-8} , cultivadas em Caldo E.C. a $44,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria durante 48 horas. Previamente estas amostras foram diluídas em AP, semeadas em CBVBL 2 % e cultivadas a 37°C durante 48 horas, resultando na análise de coliformes totais.

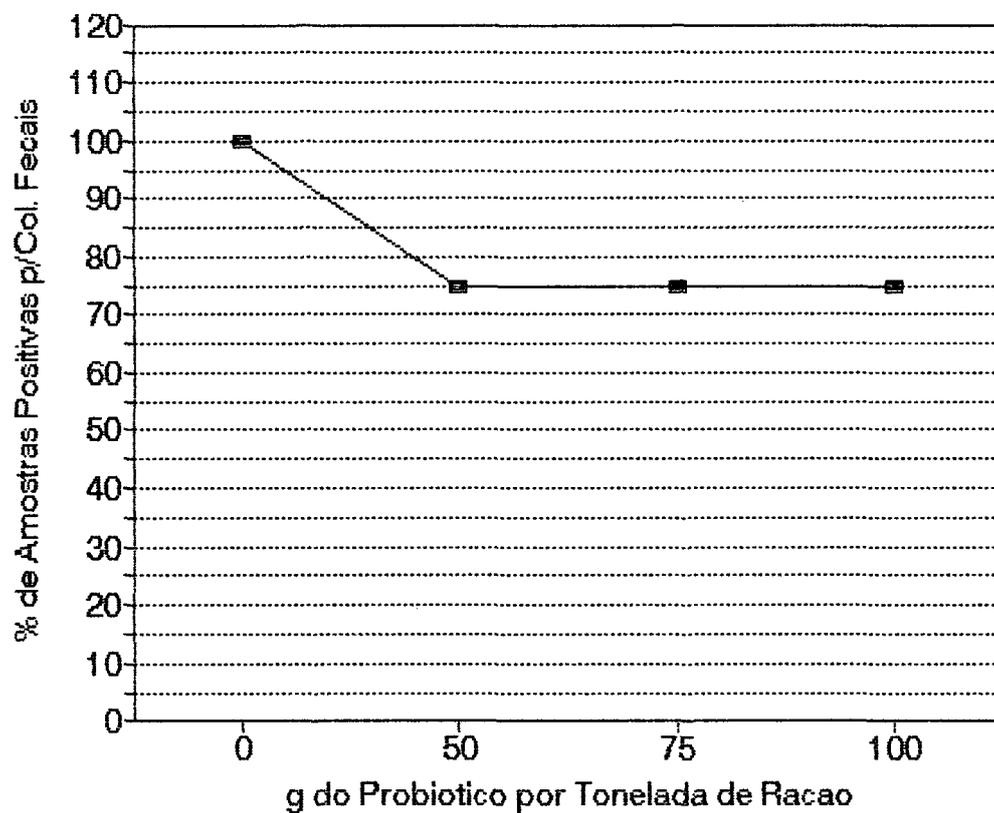


Figura 6: Porcentagem de amostras de conteúdo intestinal de frangos de corte, aos 47 dias de idade, positivas para coliformes fecais, na diluição 10^{-9} , cultivadas em Caldo E.C. a $44,5^{\circ}\text{C}$ em banho-maria durante 48 horas. Previamente estas amostras foram diluídas em AP, semeadas em CBVBL 2 % e cultivadas a 37°C durante 48 horas, resultando na análise de coliformes totais.

O processamento laboratorial para isolamento de *Campylobacter spp.* em fezes deve ser o mais rápido possível, não ultrapassando 6 horas, conforme indica MODOLO et al. (1987). Segundo CABRITA et al. (1988), a utilização de meio de enriquecimento não contribui para um aumento na taxa de isolamento comparativamente ao isolamento direto a partir de amostras de conteúdo fecal humano. BEUCHAT (1986) e TERZOLO (1988) também sugerem o plaqueamento direto de conteúdo fecal fresco.

A colheita do material e o seu processamento laboratorial influenciam o isolamento de *C. jejuni*, bem como de qualquer outro microrganismo.

As técnicas utilizadas neste experimento para o isolamento de *C. jejuni* foram as mesmas utilizadas pelo laboratório da Secretaria da Saúde do Paraná.

O meio de cultura utilizado para o isolamento e enumeração de *C. jejuni* das amostras foi o Tryptic Soy Agar, acrescido de uma solução de antimicrobianos na proporção recomendada por BLASER et al. (1980) e WANG et al. (1982), citados por MOSSEL (1985). Também foi adicionado a este meio de cultura 6 % de sangue desfribinado de carneiro, o que favorece o isolamento de *C. jejuni* segundo STERN et al. (1985). É possível a tentativa de isolamento utilizando-se meio de cultura não acrescido de sangue, desde que se adicionem o sulfato ferroso e o piruvato de sódio, como agentes redutores (MOSSEL, 1985).

O material, puro ou diluído em água peptonada (pH = 7,0) até 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , distribuído em placas de Petri

contendo TSA, foi incubado à 42^o C durante 72 horas sob condições de microaerofilia por passivação do cobre.

A obtenção de microaerofilia por passivação do cobre foi descrita por ATTEBERY et al. (1970) e citada na pesquisa de MAGALHÃES et al. (1982), onde compara a eficácia do método que utiliza GasPak no isolamento de *C. jejuni* com o método que utiliza lâ de aço. MAGALHÃES et al. (1982) constatou que o método que utiliza lâ de aço provê uma atmosfera apropriada, para o isolamento de *C. jejuni* das fezes, de forma tão eficiente como àquelas condições providas pelo uso do GasPak em jarra de anaerobiose sem o catalisador, com a vantagem de ser muito menos dispendioso.

FRANCO (1988) obteve o isolamento e contagem de *C. jejuni*, a partir de produtos comestíveis de frango de corte, com o uso da passivação do cobre, pelo método que utiliza lâ de aço para obter microaerofilia.

Neste trabalho de pesquisa certamente haveriam resultados mais conclusivos a respeito da redução de *Campylobacter jejuni* frente ao uso do probiótico *Bacillus natto* se a bactéria *Campylobacter jejuni* tivesse se estabelecido no trato intestinal das aves deste experimento. O estabelecimento de *C. jejuni* na microbiota intestinal dos frangos de corte deste experimento poderia ser favorecido através da inoculação oral de cultura deste microrganismo. Predispondo desta forma uma avaliação do efeito competitivo do *B. natto* frente a *C. jejuni*.

Muitos autores se utilizam também do processo de filtração da amostra diluída através de um filtro com poros de

0,65 micrômetros, como artifício de seletividade para *C. jejuni*. Entretanto, segundo PARK et al. (1981), citado por BEUCHAT (1986), mais de 80 % do número de *C. jejuni* contido na amostra fica retido no filtro e algumas espécies de *Pseudomonas* e *Proteus* são filtráveis também.

WARD et al. (1991), numa recente pesquisa, obteve sucesso no isolamento de algumas espécies de *Campylobacter* através da inoculação de secção intestinal triturada e diluída, de suínos com enterite hemorrágica proliferativa, na membrana vitelina de ovos embrionados, com 7 dias de incubação.

C. jejuni é um organismo microaerófilo que cresce muito bem à temperatura de 42^oC. O fator temperatura poderia servir como um artifício de seletividade, porém a temperatura de 42^oC não suprime o crescimento de *Pseudomona aeruginosa* (MOSSEL, 1985). Devido a existência da competição bacteriana, por parte da microbiota prevalente no intestino de frangos de corte, a *C. jejuni* cresce mais lentamente que outras bactérias entéricas. Por este motivo deve-se utilizar meio de cultura, com mistura de antibióticos seletivos, e condições apropriadas de incubação quanto à temperatura e à microaerofilia para o seu isolamento. Estes requisitos foram atendidos no presente trabalho.

Podem ser utilizados vários tipos de ágar seletivos para isolamento e identificação de *C. jejuni*. Dentre os mais utilizados citam-se o Agar Columbia, Agar Brucella, Agar Tioglicolato, Tryptic Soy Agar, Agar Skirrow e Agar Butzler. Nesta pesquisa utilizou-se o TSA enriquecido (MOSSEL, 1985).

Segundo MOSSEL (1985) a identificação definitiva do gênero *Campylobacter*, como um patógeno entérico do homem, se deu por volta de 1970. Investigações mais profundas das técnicas de isolamento têm sido desenvolvidas nestes últimos anos.

Neste experimento foi possível comprovar a eficiência do meio de cultura e das condições de incubação, quanto à temperatura e à microaerofilia, através do isolamento de *C. jejuni* de material fecal de uma galinha de criação caseira. Esta cepa de *C. jejuni* foi semeada em placas de Petri com o meio de cultura utilizado nesta pesquisa, crescendo satisfatoriamente durante toda a duração do teste, correndo-se uma prova paralela e simultânea com o material do experimento. Nestas placas ocorreu o crescimento da *C. jejuni*, ao passo que naquelas do experimento não. Isto evidencia, possivelmente, o não estabelecimento deste microrganismo nas aves criadas em gaiolas, conforme menciona GENIGEORGIS (1987), pela ausência de fatores de veiculação e disseminação do microrganismo em questão.

IV - SUMARIO

O principal objetivo da presente pesquisa foi o estudo da influência do probiótico, contendo *Bacillus natto* cepa BN, na microflora intestinal de frangos de corte. Foram analisadas as variações nas taxas de coliformes fecais e de *Campylobacter jejuni*. O efeito competitivo do *Bacillus natto* em relação a estas bactérias foi analisado em 32 frangos de corte machos, sujeitos a quatro diferentes tratamentos, A, B, C e D, contendo, respectivamente, 0, 100, 75 e 50 gramas do probiótico por tonelada de ração. O probiótico utilizado neste experimento contém 10^9 *Bacillus natto* cepa BN por grama. Caldo Bile Verde Brilhante Lactose 2 % e Caldo E.C. foram utilizados para a análise de coliformes fecais. *Campylobacter jejuni* foi estudada através do uso do meio Tryptic Soy Agar enriquecido incubado a 42^o C sob condições de microaerofilia. A adição do probiótico à ração dos frangos de corte causou uma nítida redução no número de coliformes fecais, quando comparada com a amostra controle. Por outro lado, não foram obtidos resultados quaisquer com *Campylobacter jejuni*, devido ao fato da impossibilidade de demonstrar sua presença nas amostras estudadas, talvez devido ao fato destas amostras serem provenientes de aves criadas em gaiola.

V - ABSTRACT

The main aim of the present research was the study of the influence of probiotic, containing *Bacillus natto* strain BN, on the chicken intestinal microflora, fecal coliforms and *Campylobacter jejuni*. The competitive effect of *Bacillus natto* in regard to these bacteria was analyzed in 32 male chickens subjected to four different treatments, A, B, C and D, containing, respectively, 0, 100, 75 and 50 grams of probiotic per ton of feed. The probiotic used in this experiment contained 10^9 *Bacillus natto* strain BN per gram. Broth Bile Brilliant Green Lactose 2 % and Broth E.C. were used for the fecal coliforms. *Campylobacter jejuni* was studied by means of the Tryptic Soy Agar enriched incubated at 42° C under microaerobic conditions. The addition of probiotic to the chicken feed caused a neat reduction on the number of fecal coliforms, when compared with the control sample. On the other hand, no results were obtained with *Campylobacter jejuni* due to the fact of impossibility to demonstrate its presence in the samples studied, maybe due to the fact that they were from fowl bred in cages.

VI - CONCLUSÕES

- 6.1 - Nas condições em que esta pesquisa foi realizada, ocorreu depressão significativa da colonização da microbiota intestinal de frangos de corte por coliformes fecais com a utilização do probiótico contendo 10^9 *Bacillus natto* por grama, na dosagem de 100,00 gramas por tonelada da ração.
- 6.2 - Quando utilizado em dosagens menores, como 75,00 ou 50,00 gramas por tonelada de ração, o probiótico provocou leve depressão na colonização por coliformes fecais.
- 6.3 - A análise dos dados obtidos em laboratório sugerem uma dosagem mínima de 100,00 gramas do probiótico, sendo 10^9 *Bacillus natto* por grama, por tonelada de ração, e ainda, que resultados possivelmente melhores seriam obtidos com o uso de dosagens maiores do que esta, nas condições em que foi realizada esta pesquisa.
- 6.4 - A análise de variação nas taxas de *Campylobacter jejuni*, na microbiota intestinal dos frangos de corte com o uso deste probiótico, não foi possível, porque

não houve crescimento desta bactéria nem no material cecal puro nem no diluído quando semeados em meio de cultura próprio. Isto se deve ao fato dos frangos terem sido criados em baterias (gaiolas) e ainda, pelas instalações estarem em vazío sanitário a mais de 180 dias.

VII - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMIG, J.S.; GEMAEL, A.; SOUZA, G.A. & BONA FILHO, A. (1989) Normas e Padrões de Nutrição e Alimentação Animal 89/90, Editora Nobel, São Paulo, pp. 28-29.
- BEERY, J. T. ; HUGDAHL, M. B. & DOYLE, M. P. (1988) Colonization of Gastrointestinal Tracts of Chicks by *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 54(10):2365-2370.
- BEUCHAT, L.R. (1986) Methods for Detecting and Enumerating *Campylobacter jejuni* and *Campilobacter coli* in Poultry. Poultry Science. 65:2192-2198.
- CABRITA, J. & PIRES, I.R. (1988) Pesquisa de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em Fezes de Trabalhadores de Aviários e Matadouros. Rev. Port. Ciênc. Veter. 83(487):313-323.
- CHAN, F.T.H. & MACKENZIE, A.M.R. (1982) Enrichment Medium and Control System for Isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from Stools. Journal of Clinical Microbiology. 15(1):12-15.
- CHAPMAN, J.D. (1988) Probiotics, Acidifiers and Yeast Culture: a Place for Natural Aditives in Pig and Poultry Production. Biotechnology in the Feed Industry. pp. 219-229.
- CHRISTOPHER, F.M.; SMITH, G.C. & VANDERZANT, C. (1982) Examination of Poultry Giblets, Raw Milk and Meat for *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. Journal of Food Protection. 45(3):260-262.
- DROMIGNY, E.; VACHINE, I.; JOUVE, J.L. & BUISSET, A. (1985) *Campylobacter* Chez La Dinde a L'Abattoir: Contamination a Différents Stades de Préparation. Revue Méd.; vet. 136(10):713-720.
- FRANCO, R.M. (1988) Isolamento de *Campylobacter jejuni* em Carnes de Aves e Miúdos. Arq. Flum. Med. Veter. 3(3):68-71.
- FRICKER, C.R. & METCALFE, N. (1984) *Campylobacters* in Wading Birds (Charadrii): Incidence, Biotypes and Isolation Techniques. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene. 179(5):469-475.

- FULLER, R. (1988) Basis and Efficacy of Probiotics. World's Poultry Science Journal. 44:69-70.
- GENIGEORGIS, C. (1987) A Importância do *Campylobacter* na Avicultura. Avicultura Industrial. Agosto, pp. 6-12.
- GRANT, I.H.; RICHARDSON, N.J. & BOKKENHEUSER, V.D. (1980) Broiler Chickens as Potential Source of *Campylobacter* Infections in Humans. Journal of Clinical Microbiology. 11(5):508-510.
- HARRIS, N.V.; WEISS, N.S. & NOLAN, C.M. (1986) The Role of Poultry and Meats in the Etiology of *Campylobacter jejuni/coli* Enteritis. Am. J. Public Health. 76(4):407-411.
- HARVEY, S.M. (1980) Hippurate Hidrolysis by *Campylobacter fetus*. Journal of Clinical Microbiology. 11(4):435-437.
- HÉBERT, G.A.; HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; LAMBERT, M.A.; BLASER, M.J. & MOSS, C.W. (1982) 30 Years of *Campylobacter*: Biochemical Characteristics and a Biotyping Proposal for *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology. 15(6):1065-1073.
- INDOKA, S.; UEHARA, S. & KIMURA, M. (1986) The Effect of *Bacillus natto* on the T and B Lymphocytes from Spleens of Feeding Chickens. Poultry Science. 65:1217-1219.
- IZAT, A.L. & GARDNER, F.A. (1988 a) Incidence of *Campylobacter jejuni* in Processed Egg Products. Poultry Science. 67:1431-1435.
- IZAT, A.U.; GARDNER, F.A.; DENTON, J.H. & GOLAN, F.A. (1988 b) Incidence and Level of *Campylobacter jejuni* in Broiler Processing. Poultry Science. 67:1568-1572.
- JIRAPHOCAKUL, S.; SULLIVAN, T.W. & SHAHANI, K.M. (1990) Influence of a Dried *Bacillus subtilis* Culture and Antibiotics on Performance and Intestinal Microflora in Turkeys. Poultry Science. 69:1966-1973.
- JONES, F.T. (1991) Use of Direct-Fed Microbials not New; Way They Work Still not Clear. Feedstuffs. Janeiro, pp. 17-19.
- KOZASA, M. (1989) Probiotics for Animal use in Japan. Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz. 8(2):517-531.
- MAGALHAES, M. & ANDRADE, M.A. (1982) Simple and Inexpensive Method for Culturing *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. Rev. Microbiol. 13(2):124-125.
- MEHLMAN, I.J. (1983) Coliforms, Fecal Coliforms, *Escherichia coli* and Enteropathogenic *Escherichia coli*. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Editor American Public Health Association, Washington, 2a. Ed., pp. 265-285.

- MILES, R.D.; JANKY, D.M.; WOODWARD, S.A.; HARMS, R.H.; BUTCHER, G.D. & HENRY, P.R. (1989) Antibiotic Effects on Broiler Performance, Intestinal Tract Strength and Morphology. University of Florida, Department of Animal Science.
- MODOLO, J.R.; BISPING, W. & KIRPAL, K. (1987) Isolamento de *Campylobacter sp.* de Bezerros com e sem Diarréia. Pesq. Vet. Bras. 7(1):23-25.
- MOSSEL, D.A.A. (1985) Media for *Campylobacter jejuni* and other Campylobacters. International Journal of Food Microbiology. 2:119-122.
- MULDER, R.W.A.W. (1991) Probiotics as a Tool Against Salmonella Contamination. Misset - World Poultry. 7(3):36-37.
- MUNROE, D.L.; PRESCOTT, J.L. & PENNER, J.L. (1983) *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Serotypes Isolated from Chickens, Cattle and Pigs. Journal of Clinical Microbiology. 18(4):877-881.
- OJENIYI, A. A. (1989) Public Health Aspects og Bacterial Drug Resistance in Modern Battery and Town/Village Poultry in the Tropics. Acta Veterinaria Scandinavica. 30(2):127-132.
- OOSTEROM, J.; NOTERMANS, S.; KARMAN, H. & ENGELS, G.B. (1983) Origin and Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Poultry Processing. Journal of Food Protection. 46(4):339-344.
- OWINGS, W.J.; REYNOLDS, D.L.; HASIAK, R.J. & FERKET, P.R. (1990) Influence of Dietary Supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on Broiler Body Weight, Feed Conversion, Carcass Characteristics and Intestinal Microbial Colonization. Poultry Science. 69:1257-1264.
- OZAWA, K.; YABU-UCHI, K.; YAMANAKA, K.; YAMASHRRA, Y.; UEBA, K. & MIWATANI, T. (1979) Antagonistic Effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on Growth of *Candida albicans*. Microbiol. Immunol. 23(12):1447-1456.
- PARK, C.E.; STANKIEWICZ, Z.K.; LOVETT, J. & HUNT, J. (1981) Incidence of *Campylobacter jejuni* in Fresh Eviscerated Whole Market Chickens. Can. J. Microbiol. 27:841-842.
- POLLMANN, D.S. (1986) Probiotics in Pig Diets. Central Soya Feed Research, Decatur, Indiana, U.S.A. pp. 193-205.
- ROGOL, M.; SECHTER, I.; GREENBERG, Z.; MIZRACHI, R.; SHTARK, Y. & ALFI, S. (1985) Contamination of Chicken Meat and Environment with Various Serogroups of *Campylobacter jejuni/coli*. International Journal of Food Microbiology. 1:271-276.

- SOERJADI, A.S.; SNOEYENBOS, G.H. & WEINACK, O.M. (1982) Intestinal Colonization and Competitive Exclusion of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* in Young Chicks. Avian Diseases. 26(3):520-524.
- STERN, N.J.; ROTHENBERG, P.J. & STONE, J.M. (1985) Enumeration and Reduction of *Campylobacter jejuni* in Poultry and Red Meats. Journal of Food Protection. 48(7):606-610.
- TERZOLO, H.R. (1988) Identification of *Campylobacters* from Bovine and Ovine Faeces. Revista Argentina de Microbiologia. 20:53-68.
- TORTUERO, F. (1973) Influence of the Implantation of *Lactobacillus acidophilus* in Chicks on the Growth, Feed Conversion, Malabsorption of Fats Syndrome and Intestinal Flora. Poultry Science. 52:197-203.
- WARD, G.E. ; HARP, K.J. & JONES, G.F. (1991) Use of Embrionating Eggs for Isolation of *Campylobacter species* from Intestines of Swine with Proliferative Enteritis. Am. J. Vet. Res.. 52(6):810-812.
- WATKINS, B.A.; MILLER, B.F. & NEIL, D.H. (1982) In vivo Inhibitory Effects of *Lactobacillus acidophilus* Against Pathogenic *Escherichia coli* in Gnotobiotic Chicks. Poultry Science. 61:1298-1308.
- YOGASUNDRAM, K; SHANE, S.M.; GRODNER, R.M.; LAMBREMONT, E.N. & SMITH, R.E. (1987) Decontamination of *Campylobacter jejuni* on Chicken Drumsticks Using Chemicals and Radiation. Veterinary Research Communications. 11:31-40.