

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JAMILE CRUXEN MOTHCI

**AValiação DA QUALIDADE INTESTINAL E DESEMPENHO DE FRANGOS DE
CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO
DE PROBIÓTICO**



PALOTINA

2017

JAMILE CRUXEN MOTHCI

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE INTESTINAL E DESEMPENHO DE FRANGOS DE
CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO
DE PROBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição e Produção Avícola, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jovanir Inês Müller Fernandes.

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M918 Mothci, Jamile Cruxen
Avaliação da qualidade intestinal e desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes formas de administração de probiótico / Jamile Cruxen Mothci . -- Palotina, 2017
97f.

Orientadora: Jovanir Inês Müller Fernandes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência animal.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Classificação filogenética.
3. Morfologia intestinal. I. Fernandes, Jovanir Inês Müller.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.6

TERMO DE APROVAÇÃO

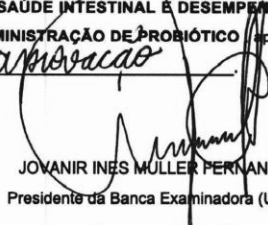


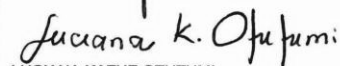
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JAMILE CRUXEN MOTHCI** intitulada: **AVALIAÇÃO DA SAÚDE INTESTINAL E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO**. Após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Palotina, 24 de Abril de 2017.


JOVANIR INÊS MULLER PERMANDES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUCIANA KAZUE OTUTUMI
Avaliador Externo (UNIPAR)


EDNA TEREZA DE LIMA
Avaliador Interno (UFPR)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Jamile Cruxen Mothci, filha de Iara Maria Cruxen La Paz e Vladimir Berchon Mothci, nasceu na cidade de Santana do Livramento, Estado do Rio do Sul, no dia 22 de fevereiro de 1974.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria, Rio do Grande do Sul, em março de 2001, concluído em dezembro de 2008.

Em março de 2015, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

Ao ser Criador, meu Deus
Por estar sempre ao meu lado e abençoar minha caminhada
À minha família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, que por meio das ações da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, possibilitou a realização desse mestrado.

À professora, Doutora Jovanir Inês Müller Fernandes pelos ensinamentos, orientações precisas e amizade que construímos juntas.

Aos (Às) professores (as) do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição e Produção Avícola, pela sapiência e a forma como nos encaminham para o conhecimento.

Aos (Às) amigos (as), colegas mestrandos e grandes colaboradores (as) Anete Rorig e Joice Meri Schmidt, pela ajuda pessoal na hora da incerteza e dedicação na condução do experimento.

Aos (Às) colegas na iniciação científica pela convivência que possibilitou troca de experiência e aperfeiçoamento pessoa.

Agradecimento especial à colega e amiga Adrieli Braga de Cristo, pela sua dedicação ímpar a nossa amizade e ao sonho comum de realizar nosso mestrado.

Ao meu pai, amado, querido, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de homem íntegro e profissional dedicado.

Aos funcionários, colaboradores indispensáveis na realização do experimento. Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que essa fase de minha formação profissional se tornasse realidade.

RESUMO

O objetivo desse experimento foi avaliar a qualidade intestinal e o desempenho produtivo de frangos de corte suplementados com probiótico elaborado à base de esporos do *Bacillus subtilis* (10^9 UFC/g). O experimento foi realizado no Biotério Experimental de Aves da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, no incubatório de uma Agroindústria da região Oeste do Paraná, utilizando-se para tal 640 pintos, machos, linhagem *Cobb*, em um delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 4 x 2 (4 formas de administração: dieta isenta de probiótico – controle negativo, probiótico *in ovo*, probiótico via *spray* pós-eclosão e probiótico na ração vs. 2 condições sanitárias), obtendo-se oito dietas, com oito repetições contendo dez aves por gaiola, totalizando 64 unidades experimentais. A análise estatística revelou que a inoculação de probiótico *in ovo* à base de *Bacillus subtilis* não interferiu com a eclodibilidade e mortalidade embrionária. A inoculação de probiótico *in ovo* à base de *Bacillus subtilis* e a suplementação da ração resultaram no melhor desempenho produtivo na fase inicial de um a 21 dias (1-21d) de idade dos frangos em relação à dieta isenta de probiótico e à aplicação probiótica por *spray*. As diferentes formas de administração de probiótico alteraram principalmente a morfometria do duodeno e mostraram relação com os resultados obtidos para o desempenho produtivo. As lesões macroscópicas observadas na mucosa intestinal foram mais intensas quando a dieta usada não continha probiótico e as aves submetidas ao desafio sanitário. Na composição da microbiota intestinal prevaleceu o filo *Firmicutes* tanto no intestino delgado como no ceco, independentemente do desafio sanitário. Em relação à classificação filogenética do gênero, no intestino delgado, houve maior prevalência dos gêneros pertencentes à ordem *Lactobacilales*. O gênero *Alistipes* e *Bacterioides* da ordem *Enterobacteriales* ocorreu com maior frequência no ceco das aves desafiadas em relação às não desafiadas. A utilização de probiótico à base de *Bacillus subtilis* de forma contínua na ração resultou no maior equilíbrio da microbiota do íleo e do ceco em relação às demais formas de aplicação. O desafio sanitário alterou a frequência das bactérias que compõem a microbiota do ceco de forma mais evidente que a ileal, indicando estreita relação entre a microbiota intestinal dos frangos com a microbiota da cama. Os resultados indicam que, consideradas as condições do desafio e do delineamento experimental, o uso de probiótico elaborado à base de esporos do *Bacillus subtilis* pode contribuir para a manutenção da saúde e favorecer o desempenho produtivo dos frangos de corte.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, classificação filogenética, desempenho produtivo, morfologia intestinal, probiótico.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the intestinal quality and the productive performance of broilers supplemented with probiotics based on *Bacillus subtilis* spores (10^9 CFU/g). The experiment was carried out in the experimental poultry of the Federal University of Paraná (UFPR), Palotina Sector, in the hatchery of an Agroindustry of the western region of Paraná, using 640 male chicks, Cobb lineage, in a completely randomized design, 4 x 2 factorial scheme (4 forms of administration: probiotic-free diet - negative control - probiotic in ovo, probiotic via post-hatching spray and probiotic in ration vs 2 sanitary conditions), obtaining eight diets, eight replicates. In ten birds per cage, totalizing 64 experimental units. Statistical analysis revealed that inoculation of probiotic in egg with *Bacillus subtilis* did not interfere with hatchability and embryonic mortality. Inoculation of probiotic in egg based on *Bacillus subtilis* and feed supplementation resulted in the best productive performance at the initial stage one to twenty-one days (1-21d) age of the broilers in relation to the probiotic-free diet and the application probiotic by spray. The different forms of probiotic administration mainly altered the morphometry of the duodenum and showed a relationship with the results obtained for the productive performance. The macroscopic lesions observed in the intestinal mucosa were more intense when the diet used did not contain probiotic and the birds submitted to the sanitary challenge. In the intestinal microbiota composition the Firmicutes phyla prevailed in both the small intestine and the cecum, independently of the sanitary challenge. Regarding the phylogenetic classification of the genus, in the small intestine, there was a higher prevalence of genera belonging to the Lactobacillus order. The genus *Alistipes* and *Bacterioides* of the order Enterobacteriales occurred more frequently in the cecum of the challenged birds than the unchallenged ones. The use of *Bacillus subtilis* probiotic continuously in the diet resulted in a greater balance of intestinal microbiota and cecum in relation to other forms of application. The health challenge altered the frequency of the bacteria that make up the microbiota of the cecum more clearly than the intestine, indicating a close relationship between the intestinal microbiota of the chickens and the bed microbiota. The results indicate that, considering the challenge conditions and the experimental design, the use of probiotics based on *Bacillus subtilis* spores can contribute to the maintenance of health and favor the productive performance of broilers.

Key words: *Bacillus subtilis*, phylogenetic classification, productive performance, intestinal morphology, probiotic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FILO-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	67
FIGURA 2 - FILO-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	67
FIGURA 3 - CLASSE-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	68
FIGURA 4 - CLASSE-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	68
FIGURA 5 - ORDEM-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	69
FIGURA 6 - ORDEM-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	70
FIGURA 7 - FAMÍLIA-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	71
FIGURA 8 - FAMÍLIA-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	71
FIGURA 9 - GÊNERO-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	72

FIGURA 10 - GÊNERO-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	73
FIGURA 11 - ESPÉCIE-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	74
FIGURA 12 - ESPÉCIE-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 - DIETAS EXPERIMENTAIS	42
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA EXPERIMENTAL DOS FRANGOS.....	43
TABELA 3 - ECLODIBILIDADE E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA DE PINTOS INOCULADOS IN OVO COM PROBIÓTICO.....	46
TABELA 4 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE DE 1 A 7 DIAS, 7 A 21 DIAS E 1 A 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	48
TABELA 5 - DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE AS DIETAS E DESAFIO SANITÁRIO SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO PARA FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	49
TABELA 6 - MORFOMETRIA DA MUCOSA DO DUODENO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	50
TABELA 7 - DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE AS DIETAS E DESAFIO SANITÁRIO SOBRE A MORFOMETRIA DO DUODENO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	52
TABELA 8 - MORFOMETRIA DA MUCOSA DO JEJUNO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	53
TABELA 9 - MORFOMETRIA DA MUCOSA DO ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	53
TABELA 10 - ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CONDIÇÃO INFLAMATÓRIA DA MUCOSA DO DUODENO, JEJUNO E ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO	54

CAPÍTULO II

TABELA 1 - DIETAS EXPERIMENTAIS	63
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA EXPERIMENTAL DOS FRANGOS.....	64
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS PRIMERS UTILIZADOS NESTE ESTUDO	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO LITERATURA	15
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL	15
2.2 PROBIÓTICO	19
2.2.1 <i>Bacillus</i> spp.	22
2.2.2 Administração de Probióticos no Incubatório – estratégia para a colonização precoce.....	24
2.2.3 Administração de Probióticos Pós-Eclosão – estratégia à recolonização	27
REFERÊNCIAS	29
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
CAPÍTULO I – DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE 1 A 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS AO DESAFIO SANITÁRIO	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO II – DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE A DIVERSIDADE DA MICROBIOTA INTESTINAL E CECAL DE FRANGOS DE CORTE DE 1 A 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS AO DESAFIO SANITÁRIO	60
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	78
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A avicultura comercial tem como objetivo a máxima produtividade a baixo custo e a oferta ao consumidor de um produto de ótima qualidade (CORRÊA et al., 2003). A competência e o dinamismo alcançado nas últimas décadas proporcionaram ao Brasil uma posição de destaque entre os maiores produtores mundiais de carne de frango. Isso se deve muito aos ganhos produtivos obtidos pelo setor, favorecidos pelos avanços tecnológicos nas áreas de genética, nutrição, equipamentos, manejo e ambiência.

Dentre esses fatores que impulsionaram a produtividade das aves, destaca-se a utilização de antibióticos promotores do crescimento (APC). Entretanto, o uso indiscriminado tem levado ao aparecimento frequente de populações bacterianas resistentes e indesejáveis (FULLER, 1989) que têm motivado a determinação de medidas duras pelas autoridades governamentais da Comunidade Europeia e de outros países (BOLDUAN, 1999; CASEWELL et al., 2003).

Ao mesmo tempo em que se discute a retirada desses produtos, é cada vez mais preocupante a questão de como manter a saúde intestinal e o desempenho produtivo das aves. Além do maior investimento em biossegurança, uma alternativa que tem apontando resultados favoráveis é a colonização intencional da microbiota intestinal com bactérias probióticas (CUKROWSKA et al., 2002) que promovem a eliminação de bactérias patogênicas sem eliminar as populações benéficas ou gerar resistência bacteriana no organismo dos frangos de corte (LINZMEIER et al., 2009; COGLIANI; GOOSSENS e GREKO., 2011).

Probiótico é um aditivo alimentar microbiano vivo, que afeta de forma benéfica o hospedeiro, por meio da melhoria do balanço microbiano intestinal (PANDA, REDDY e PRAHARAJ, 2006), seja competindo com a microbiota intestinal patogênica por nutrientes, por locais de adesão no epitélio intestinal, síntese de substâncias antibacterianas (ácidos orgânicos e bacteriocinas) e enzimas, como também o estímulo do sistema imune (FURLAN, MACARI e LUQUETTI, 2004).

No entanto, a colonização intencional da microbiota com bactérias probióticas deve ser feita o quanto antes para evitar a colonização inicial da microbiota entérica dos pintos no pós-eclosão por microrganismos patogênicos (LINZMEIER et al., 2009). A contaminação entérica por bactérias patogênicas já

ocorre logo após a eclosão. Essa contaminação é, em parte, devida a uma característica específica das aves que, diferentemente de outros animais, na eclosão os pintos não recebem inoculação natural de microrganismos benéficos. Isso ocorre devido à incubação artificial, que exclui o contato das matrizes com a progênie e do ambiente naturalmente contaminado do ninho (MILLS, LOMBARDO e THORPE, 1999). Em mamíferos, as bactérias benéficas que vivem no muco vaginal da mãe são transferidas para o intestino do neonato durante o parto. Essa transferência é complementada pela amamentação natural (FLINT e GARNER, 2009).

No pós-eclosão, a falta de contato dos pintos com aves adultas traz prejuízos para o desenvolvimento e à maturação do sistema imunológico (LU et al., 2003), sendo apontada como fator que concorre favoravelmente para o atraso na colonização do trato entérico das aves por microrganismos benéficos desejáveis (HASHEMZADEH et al., 2010).

Nesse contexto, os probióticos, por apresentarem micro-organismos vivos trariam efeitos benéficos ao hospedeiro por favorecer o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; FARIA et al., 2009). Entretanto, a eficácia dos probióticos depende da origem das espécies de micro-organismos utilizada, do método de preparo, do ambiente onde as aves são criadas, idade, linhagem, uso concomitante de antibióticos (OTUTUMI et al., 2012), assim como da formulação/composição por microrganismos vivos em culturas definidas, indefinidas ou simbióticas (GUARNER et al., 2011). Entre outros fatores não associados ao produto, porém determinante à sobrevivência das bactérias probióticas no TGI, incluem-se o agente anticoccidiano usado, a idade do lote de aves e, principalmente, a intensidade do desafio sanitário da criação (MENTEN e PEDROSO, 2005).

Além disso, a forma de aplicação dos probióticos pode interferir no sucesso da colonização entérica. Comumente, os aditivos são suplementados na ração de frangos de corte, entretanto, nem todos os probióticos podem ser utilizados em determinados tipos de processamento de ração devido a pouca resistência que apresentam em altas temperaturas. Esse fato pode ser considerado como uma desvantagem apresentada pelos probióticos (FERREIRA e KUSSUKAWA, 2008).

Outro fator importante, é que os pintos podem ser expostos aos patógenos enquanto ainda estão no incubatório, durante a classificação, sexagem, vacinação, e transporte, portanto, antes de consumir o primeiro alimento (OLIVEIRA et al., 2014). O embrião inicia a ingestão do líquido amniótico no 15º dia de incubação, quando

ingere microrganismos presentes no ovo, e, dessa forma, também se inicia a colonização do TGI das aves (MENTEN; PEDROSO, 2005).

A prática de vacinação *in ovo* em incubatórios comerciais tem facilitado a mão de obra nestes sistemas, considerando o intenso fluxo e o volume de ovos a serem manejados diariamente. Embora requeira gerenciamento preciso durante a execução, não se observa efeito negativo sobre a eclodibilidade quando o procedimento é realizado corretamente (GONÇALVES et al., 2013). A mesma técnica pode ser utilizada para colonizar o intestino dos embriões antes da eclosão.

A inoculação de probiótico ainda no incubatório pode ser viável na forma de *spray*, sistema também já testado experimentalmente na imunização dos pintos. Há que se considerar, então, que a inoculação precoce de bactérias probióticas nas aves ainda no incubatório sinaliza potencial desenvolvimento de áreas da avicultura como nutrição e sanidade, por meio da instalação de uma microbiota saudável que pode acelerar o desenvolvimento entérico e a digestão de nutrientes (ROTO; KWON e RICHE, 2016).

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies de bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico. Aquelas que colonizam o trato intestinal no início tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a microbiota intestinal (ZHU et al., 2002).

A composição da microbiota bacteriana intestinal é afetada pelas bactérias presentes no intestino e pelos microrganismos naturais do ambiente (YIN et al., 2010). O embrião pode ser colonizado por via vertical, durante a formação do ovo, pelos microrganismos presentes no sistema reprodutor. Essa colonização também pode ocorrer pela ingestão do conteúdo do fluido amniótico a partir do 14º dia de incubação (PEDROSO, 2011), pois o saco vitelínico infectado permite absorção de microrganismos junto com o conteúdo do saco da gema (DEEMING, 2005).

No período pós-eclosão, a microbiota intestinal da ave é formada por meio da ingestão ou pelo contato com ambiente que contenha microrganismos, daí a relevância do manejo adequado no criatório. Cressman et al. (2010) retratam o importante papel da cama do aviário no estabelecimento da microbiota intestinal dos pintos. Esses autores observaram que camas novas continham mais bactérias ambientais e as aves criadas nessas camas abrigaram as bactérias de origem dessa cama. Por sua vez, camas reutilizadas continham mais bactérias de origem intestinal e os pintos criados nessa cama foram amplamente colonizados por essas bactérias.

O desenvolvimento intestinal das aves não é semelhante em seus diferentes segmentos. A formação total da microbiota se dá imediatamente após o nascimento das aves e aumenta durante as primeiras semanas de vida até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbicas (ZHU et al., 2002; APAJALAHTI, KETTUNES e GRAHAM, 2004). Nessa microbiota encontram-se, principalmente, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (GUSILS et al., 1999).

No entanto, utilizando técnicas de ácido desoxirribonucleico microbiano (DNA), pesquisadores observaram que 90% das bactérias presentes no TGI das aves eram desconhecidas e revelaram, ainda, que a quantidade de bactérias pode alcançar, respectivamente, 10^{11} e 10^9 UFC por grama de conteúdo cecal e ileal

durante os primeiros três dias pós-eclosão, permanecendo relativamente estável nos próximos trinta dias (APAJALAHTI, KETTUNES e GRAHAM, 2004).

O número e a composição dos microrganismos da microbiota intestinal das aves variam consideravelmente ao longo do TGI. No inglúvio há predominância de lactobacilos que, ao produzirem ácidos láctico e acético, reduzem o pH, impedindo o crescimento de bactérias patogênicas (ANDREATTI FILHO et al, 1993; ANDREATTI FILHO, 2007). O pH no proventrículo e moela é extremamente baixo, e poucas bactérias são capazes de tolerar este ambiente. No duodeno, o pH é neutro e há condições para a colonização de microrganismos. O ceco é reconhecido como o segmento intestinal de maior colonização de microrganismos. Nesse segmento, há grande número de bactérias Gram-positivas e negativas (MACARI et al., 2014).

O perfil da microbiota pode ser também alterado por diversos fatores, tanto endógeno quanto exógenos. As más condições higiênicas e sanitárias da criação, estresse, alimentação inadequada, intoxicação e enfermidade concomitante, podem desencadear o aumento da proliferação bacteriana que competirá por nutrientes da própria ave (ITO, MIYAJI e OKABAYASHI, 2007).

As mais de 800 espécies de bactérias que exercem impacto significativo sobre o estado nutricional e saúde do hospedeiro podem encontrar-se, tanto associadas intimamente ao epitélio, ou livres na luz intestinal. As livres multiplicam-se rapidamente para compensar a eliminação pelo peristaltismo intestinal ou ainda agregam-se às demais bactérias que se encontram aderidas na mucosa intestinal (LAPARRA e SANZ, 2010).

Essa variada composição da microbiota intestinal pode ser tanto benéfica quanto maléfica para o hospedeiro, dependendo da natureza e quantidade de microrganismos (RINTTILÄ e APAJALAHTI, 2013). Os efeitos maléficos comumente descritos na literatura são: diarreia, infecções, distúrbios hepáticos, carcinogênese, putrefação intestinal, redução da digestão e absorção de nutrientes (FURLAN; MACARRI e LUQUETTI, 2004). Os benefícios vinculam-se à inibição do crescimento de bactérias patogênicas, aos estímulos ao sistema imune, à síntese de vitaminas, redução da produção de gases, melhor digestão e absorção dos nutrientes (YANG et al., 2004; MACARI; LUNEDO e PEDROSO, 2014).

As bactérias benéficas na microbiota têm funções específicas, como a de estimular a produção de mucina para a inibição da translocação bacteriana (MATTAR et al., 2002), modular a expressão de genes que exercem funções como

absorção, fortificar a barreira mucosa, metabolismo e maturação de células, bem como auxiliar os mecanismos de defesa do sistema imune (ZOCCO et al., 2007) e promover a exclusão competitiva que tem a finalidade de impedir a colonização por patógenos invasores (LAN et al., 2005).

Os microrganismos benéficos na microbiota das aves têm características próprias. Assim, por exemplo, as espécies do gênero *Lactobacillus* (L.) tais como *L. salivarius*, *L. fermentum* e *L. reuteri* no intestino delgado; *L. acidophilus* no duodeno, jejuno, ceco e cloaca (ANDREATTI FILHO e SAMPAIO, 1999), e *L. reuteri* e *L. salivarius* no ceco (BARROS et al., 2009) têm a função de contribuir para a imunidade da ave pelo estímulo à secreção de imunoglobulina IgA intestinal, secreção de lactato, acetato, succinato e etanol.

Na microbiota das aves, essa comunidade específica contribui também com a proliferação de outras bactérias benéficas como *Veillonella* spp., *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteriodes* spp. (BARROS et al., 2009), as quais sintetizam ácidos graxos voláteis, diminuem a concentração de oxigênio, reduzem o pH e se aderem a mucosa intestinal e, com isso, limitam a multiplicação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (ITO; MIYAJI e OKABAYASHI, 2007; PAN e YU, 2014).

No ceco, as espécies *Bifidobacterium*, cujo *habitat* natural é o intestino delgado e grosso, e que sofrem influência por fatores exógenos como dieta, estresse e antimicrobianos, digerem oligossacarídeos não digeríveis por meio da fermentação e os utiliza como fonte de carbono e energia (GOMES e MALCATA, 1999). Dentre as contribuições dessas espécies citam-se: o estímulo do sistema imunológico pela ativação da proliferação dos macrófagos, o auxílio à digestão e à absorção de nutrientes por agirem nos sais biliares, a ação inibidora da multiplicação de patógenos pela produção de bacteriocinas e redução do pH do meio, assim como, estímulo à produção de vitamina do complexo B e auxílio à restauração da microbiota após antibioticoterapia (LEAHY et al., 2005; ANDREATTI FILHO, 2007).

Na família *Bacteroidacea* se encontram os bacilos *Fusobacterium* que compõem a microbiota normal do ceco das aves. Mas, da mesma forma que os *Bacteriodes*, que são pertencentes a essa mesma família, em existindo condições predisponentes, os bacilos *Fusobacterium* podem ser patogênicas. Os benefícios desses bacilos surgem a partir da competição com *Salmonella* spp, em busca de sítios de ligação no intestino das aves (MENTEN e LODDI, 2002; SANTOS, 2003).

Ressalta-se, no entanto, que a população bacteriana intestinal de frangos de corte e a população da microbiota existente na cama de alojamento não foram totalmente identificadas e correlacionadas (WANG; LILBURN e YU, 2016) apesar de existirem várias técnicas, desde técnicas simples, como o cultivo em placas, até mesmo as mais complexas, como o sequenciamento molecular.

As técnicas normais de cultivo limitam o entendimento dessa microbiota (PEDROSO et al., 2012), mas o estudo da ecologia intestinal por meio de técnicas moleculares tem se mostrado eficiente para conhecer e entender o ecossistema intestinal. As alterações na microbiota de diferentes segmentos do trato digestório em função de ingredientes, aditivos, tipos de cama, idade e infecções foram avaliadas em trabalhos mais recentes usando as técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (T-RFLP) (BORTOLUZZI, 2013). As técnicas baseadas na similaridade do DNA ou do ácido ribonucleico (RNA) de genes selecionados na comunidade microbiana são usadas com sucesso para caracterizar o ecossistema intestinal (PEDROSO, 2011).

Pela dificuldade de cultivo em placas das populações anaeróbias do TGI, há entraves em analisá-las pelo método convencional. Para tal finalidade, técnicas de genética molecular são utilizadas (LEDUR; BERTANI e NONES, 2003).

O microarranjo molecular, do inglês, *microarray*, é uma tecnologia usada para detectar e quantificar os ácidos nucleicos (ROSA; ROCHA e FURLAN, 2007). Van Der Hoeven-Hangoor et al. (2013) utilizaram dessa tecnologia para a caracterização da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos a diferentes dietas contendo ácidos graxos de cadeia média, polissacarídeos formadores da parede celular (PNAs) e amido. Na aplicação da técnica para purificação do material ileal, o DNA foi amplificado por PCR e, então, os autores analisaram o material pelo *microarray*.

Outra técnica descrita por Lu et al. (2003) é a extração do material genético microbiano por *kits* de isolamento de DNA e após, amplificação por PCR da região hipervariável do gene V4 16s rRNA e o sequenciamento por meio de um *software*, MiSeq Reporter. Essa técnica de determinação da ordem das bases nitrogenadas do DNA garante a especificação dos microrganismos estudados.

É importante o entendimento e o controle sobre as possíveis mudanças da microbiota intestinal para adequar o manejo e incluir, de maneira racional, aditivos que possam alterar e regular a ecologia microbiana, com o intuito de melhorar o

desempenho produtivo das aves, diminuir impactos ambientais da produção e garantir maior segurança alimentar para o consumidor final dos produtos (OVIEDO-RONDÓN, 2009; MACARI et al., 2014). O primeiro passo para o entendimento de um ecossistema é caracterizar corretamente seus membros e, depois, elucidar o papel e função nesse ecossistema (OVIEDO-RONDÓN, 2009). Nesse sentido, torna-se relevante a compreensão da relação entre as microbiotas intestinais dos frangos e da cama de alojamento, na medida em que tais ecossistemas se relacionam entre si e concorrem para a melhoria da saúde e do bem-estar das aves. Essa é uma das razões que justificam estudos sobre o uso de probióticos na avicultura de corte.

2.2 PROBIÓTICO

Os primeiros estudiosos a utilizar o termo probiótico foram Lilly e Stillwell, em 1965, a partir da observação do mecanismo de ação dos microrganismos como promotor de crescimento, definindo-os como 'pró-vida' em diferenciação ao termo antibiótico, 'contra-vida' (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004; FAO, 2106). Esses primeiros estudos datam do início do século XX, em 1907, com o trabalho de Elie Metchnikoff, vinculado ao Instituto Pauster na França, ao postular que os probióticos produzem efeitos benéficos no hospedeiro porque antagonizam bactérias patogênicas no intestino (GUARNER et al., 2011; FAO, 2016).

Outros trabalhos surgiram sobre produtos e processos com o objetivo de oferecer proteção contra a infecção por patógenos intestinais e melhorar o desempenho zootécnico de animais. Contudo, a crescente evolução das pesquisas em busca do combate aos patógenos intestinais é atribuída, em parte, à pronta disponibilidade de antibióticos no mercado, na década de 1950, que resultou na difusão desses produtos como agentes terapêuticos e estimulantes de crescimento. Com o passar do tempo, percebeu-se que o uso dos antibióticos como promotores de crescimento (APC) gerava resistência bacteriana, que dificultava o alcance de resultados na terapêutica animal (FLINT e GARNER, 2009), e que mesmo a aplicação de antibióticos como agentes terapêuticos poderia causar transtorno intestinal e desequilibrar a microbiota intestinal do hospedeiro (FULLER, 1989).

A literatura especializada explica que os primeiros gêneros e espécies bacterianas que colonizam o TGI persistem ao longo da vida do hospedeiro, passando a compor a microbiota intestinal (SALMINEN et al., 1998; LINZMEIER et

al., 2009). Porém, tais bactérias devem encontrar no hospedeiro todas as condições propícias para a colonização e persistência, como temperatura e pH adequados e oferta de nutrientes, o que requer adoção de medidas preventivas e protetivas da saúde do animal (AMIT-ROMACH e SKLAN; UNI e FERKET, 2004; FOYE e BLACK, 2006). O uso de probiótico tem sido apontado como uma dessas medidas.

Na medicina humana, os probióticos são usados na prevenção e tratamento de doenças, regulação da microbiota intestinal, como imunomoduladores em casos de distúrbios do metabolismo gastrointestinal e inibição da carcinogênese (GUARNER et al., 2011). Na medicina veterinária, além dessas aplicações, são utilizados como promotores de crescimento (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004).

As características promotoras de saúde desejadas e os critérios de segurança esperados de um probiótico são: ser isento de toxicidade e apatogênico; ter correta identificação taxonômica; ser capaz sobreviver na microbiota da espécie alvo; ter habilidade de exercer no mínimo uma característica promotora de saúde comprovada cientificamente; ser geneticamente estável; manter a estabilidade das características desejáveis da cepa durante o processamento, armazenamento e administração; ser viável em grandes populações; manter desejáveis características organolépticas e tecnológicas quando incluso no processamento industrial (GUARNER et al., 2011). Além disso, o microrganismo probiótico deve sobreviver, colonizar e ser metabolicamente ativo no sítio alvo, o que envolve a resistência ao ambiente gástrico e a bile, persistência no trato gastrointestinal, adesão ao epitélio ou muco, competição com a microbiota, produção de substâncias antimicrobianas e modulação nas respostas imunes (GAGGIA, MATTARELLI e BIAVATI, 2010).

Ao longo da história dos estudos sobre os probióticos que, inicialmente, eram definidos como suplemento alimentar composto de microrganismos vivos que beneficiavam a saúde do hospedeiro por gerar equilíbrio da microbiota intestinal (FAO, 2016), pouco a pouco, passaram a ser concebidos como cultura pura ou cultura composta por microrganismos vivos que, fornecidos ao homem ou a outros animais, beneficiavam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural (PANDA et al., 2006; COPOLLA e GIL-TURNES, 2004). Na atual fase, denomina-se alimento probiótico aquele que contém microrganismos vivos que, ingeridos em determinada concentração, afetam benéficamente a saúde do consumidor por melhorar o equilíbrio intestinal (FULLER, 1989).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), concordantemente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), considera probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro” (FAO, 2016, p. 5).

A maioria dos probióticos é composta por cultura de microrganismos ou suas L-formas (sem parede celular), não patogênicas da microbiota intestinal das aves (OTUTUMI et al., 2012). Os dois primeiros são conhecidos por resistir à ação do ácido gástrico, sais biliares e enzimas pancreáticas, e, também, pela capacidade de aderência à mucosa e rápida colonização do TGI (SALMINEN et al., 1998).

Cabe mencionar que, segundo as espécies usadas nas formulações, os probióticos podem ser definidos como colonizadores ou não colonizadores, de trânsito intestinal livre. No grupo dos colonizadores estão os probióticos elaborados à base de *Lactobacillus spp.* e *Enterococcus spp.* Entre os não colonizadores aparecem os elaborados à base de *Bacillus spp.* e *Saccharomyces cerevisiae* (HUYGHEBAERT et al., 2011 apud KURITZA, WESTPHAL e SANTIN, 2014).

As formulações probióticas comumente contêm bactérias ácido-láticas, não ácido-láticas e leveduras (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004). As espécies mais usadas nessas formulações são: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi* (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004; RAMOS, 2009; GUARNER et al., 2011; OTUTUMI et al., 2012).

Na literatura encontram-se resultados controversos em relação à eficácia de diferentes formulações de probióticos encontradas no mercado (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004). Estudos demonstram que culturas indefinidas, normalmente, apresentam melhor desempenho em comparação com um produto contendo cultura definida de microrganismos vivos (HINTON e MEAD, 1991), outros revelam que uma cultura de microrganismos definida, ao invés de culturas indefinidas, é indicada para evitar a colonização por *Salmonella enterica* (STERZO et al., 2007; ESTRADA; HERNÁNDEZ e SOTO, 2010).

A via de administração dos probióticos determina a melhor ou pior capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes na formulação do produto usado. Um fator determinante, diz respeito à dificuldade encontrada na avicultura em fazer uso dos probióticos, uma vez que os pintos eclodem e são

alojados em ambiente com alto potencial de contaminação por patógenos (NISBET et al., 1994). Outro fator concorrente é o hábito das aves de ingerir cama do aviário, o que devido à ingestão de patógenos, presentes nesse ambiente e com potencial zoonótico, contribuam para maior contaminação do TGI (CAMPOS et al., 2010; CRESSMAN et al., 2010).

Nesse sentido, a inoculação de bactérias probióticas ainda no incubatório, seja *in ovo* ou via pulverização pode ser uma alternativa aos entraves acima relatados. Por essas vias, a microbiota da ave já está “colonizada” antes do alojamento, além de contribuir para o desenvolvimento da mucosa intestinal, o que reflete na resposta imunológica do frango (PESSÔA et al., 2012). Nos primeiros dias de vida, os pintos são mais suscetíveis à colonização por patógenos devido à baixa microbiota simbiótica da mucosa do intestino (FOYE; UNI; FERKET, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2014). Oportuno mencionar que a camada de muco do epitélio intestinal é a primeira barreira física contra infecções no TGI das aves (NISBET et al., 1994; CAMPOS et al., 2010).

2.2.1 *Bacillus* spp.

Bacillus spp. são bactérias Gram-positivas, em forma de bacilo. É um gênero bacteriano ubíquo na natureza e bastante heterogêneo possuindo espécies nocivas, inócuas e benéficas à saúde. Sob condições estressantes esporulam e podem permanecer no ambiente indefinidamente (KONEMANN et al., 2001).

Esporos de *Bacillus* spp. são amplamente difundidos como probióticos e agentes de exclusão competitiva em humanos e animais, o que os diferencia das demais espécies de microrganismos utilizados que estão em sua forma vegetativa. A forma esporulada da bactéria tem a capacidade de resistir ao baixo pH do estômago e atingir o intestino em grandes quantidades, onde germina, sendo então eliminada no conteúdo fecal. Uma vez no ambiente intestinal, os esporos se multiplicam e, pelo efeito probiótico, promovem a exclusão competitiva (CASULA e CUTTING, 2002). Trabalhos que discutem o mecanismo de ação dos *Bacillus* spp. na microbiota intestinal de aves evidenciam o efeito imunoestimulante e indicam que além de melhorar a digestibilidade de nutrientes, também, modulam a microbiota e inibem a ação de patógenos (GREEN et al., 1999; WOLFENDEN et al., 2007).

O gênero *Bacillus subtilis*, identificado e descrito por Christian Gottfried Ehrenberg como *Vibrio subtilis*, em 1835, e renomado por Ferdinand Cohn, em 1872 (SLEPECKY e HEMPHILL, 2006) é de interesse expresso no escopo desse estudo. Esse gênero bacteriano foi um dos primeiros a ser estudado como modelo no desenvolvimento celular e diferencial por ter grande diversidade ribossomal 16S. Suas várias espécies são formadoras de endósporos, aeróbios ou anaeróbios facultativo, quimio-heterotróficas porque, em condições favoráveis aproveitam substratos orgânicos, algumas sendo proteolíticas, lipolíticas e amilolíticas (SLEPECKY e HEMPHILL, 2006).

A diversidade metabólica desse gênero tem impulsionado a utilização do *Bacillus subtilis* em uma ampla variedade de processos industriais, como, por exemplo, produção de enzimas hidrolíticas, antibióticos, probióticos, inseticidas e produtos alimentícios (HARWOOD, 1992; CUTTING, 2011).

Estabilidade térmica e capacidade de sobrevivência do *Bacillus subtilis* à barreira gástrica, bem como o apoio dado à função digestiva pela produção de enzimas essenciais, torna-o atraente como aditivo alimentar em dietas de animais e humanos (WESTERS; WESTERS e QUAX, 2004).

Em espécies de *Bacillus subtilis*, frequentemente, são isoladas enzimas pectinolíticas devido à sua alta atividade amilolítica, sendo que algumas de suas cepas revelam atividade lipolítica, celulolítica e proteolítica. As proteolíticas desse *Bacillus* estimulam processos de regeneração (WONG; YE e NATHOO, 1994), aumentam a atividade fibrinolítica no plasma (WU et al., 1993) e contribuem para a digestão normal por degradação dos fatores anti-nutricionais (YE et al., 1999; YANG et al., 2004). A catálise produzida por *Bacillus*, especialmente da espécie *subtilis* estimula a ação da microbiota normal do intestino animal, aumentam o crescimento e a viabilidade de sobrevivência da população de lactobacilos intestinais (MARGOT e KARAMATA, 1996).

Estirpes de *Bacillus subtilis* com superprodução de peptídeos ou enzimas antimicrobianas existem científica e comercialmente, mas apenas seus produtos são vendidos, não suas estirpes propriamente ditas. Estirpes do *Bacillus subtilis* são comercializadas em produtos probióticos, geralmente, nas concentrações 10^8 e 10^9 UFC/g, sendo utilizada como aditivo para alimentação animal, tendo aplicação em frangos de corte durante todo o período de engorda (TEO e TAN, 2007).

Devido à capacidade de estabilizar a microbiota intestinal e, com isso, melhorar a digestibilidade dos alimentos, quando incorporado à dieta, o *Bacillus subtilis* atua como um promotor de crescimento natural e estabilizador da microbiota intestinal, aplicável à recuperação de quadros de diarreia (TEO e TAN, 2007). A incorporação de probiótico à base de *Bacillus licheniformis* em dietas de suínos, perus e vitelos, demonstra ganhos no desenvolvimento do animal, atribuídos à ação do probiótico que, em conjunto com a atividade enzimática, reduz a incidência de distúrbios digestivos, o que resulta em elevado estado sanitário dos animais, permitindo melhores desempenhos produtivos e redução de custos com medicação (ZHOU et al., 2016).

Como se percebe, o uso de probióticos elaborados à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* revelam ganhos adicionais no desenvolvimento de animais. Contudo, em alguns produtos probióticos comercializados mundialmente há combinação dessas duas estirpes de *Bacillus*, com pelo menos $3,2 \times 10^9$ UFC/g de aditivo de cada estirpe, segundo o Regulamento de Execução da União Europeia (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA; MARTÍNEZ, 2006). Ambos os probióticos são indicado para uso em avicultura com a proposta de melhorar a conversão alimentar, promover ganho de peso e reduzir o uso de antimicrobianos na criação, porém sem desconsiderar a eficiência produtiva necessária à avicultura comercial.

2.2.2 Administração de Probióticos no Incubatório – estratégia para a colonização precoce

O conceito de inoculação *in ovo* ou suplementação de nutrientes na fase pré-eclosão se estabeleceu com a finalidade de melhorar o perfil nutricional da reserva de nutrientes para o embrião, o que além de possibilitar o contato de nutrientes com a mucosa intestinal da ave antes da eclosão, visa melhorar o desenvolvimento do sistema digestório e a capacidade de digestão do próprio embrião, a eclodibilidade e o desempenho da ave no período pós-eclosão (FOYE, 2005; FOYE et al., 2007).

Em aves, paralelamente à formação dos tecidos embrionários, desenvolvem-se as membranas celulares extraembrionárias, anexos embrionários, como o saco vitelínico, âmnio, alantóide e cório. Dentro do âmnio se encontra o líquido amniótico; um fluido que envolve o embrião mantendo-o em um ambiente líquido, protegendo-o, dessa forma, contra dessecação, choques mecânicos e térmicos (MORAN, 2007).

O desenvolvimento do sistema gastrointestinal do embrião acontece ao longo de toda incubação, porém suas habilidades funcionais só começam a desenvolver a partir do 15º dia de incubação, quando inicia a ingestão oral do líquido amniótico (MORAN, 2007). A partir do 16º dia, o embrião possui enzimas digestivas (SKLAN et al., 2003). O maior desenvolvimento do intestino ocorre a partir do 17º dia de incubação, quando o peso do intestino em proporção ao peso embrionário aumenta de 1% aos 17º dias para 3,5% à eclosão, aproximadamente.

Do 15º ao 19º dia de incubação, o líquido amniótico é totalmente consumido oralmente e, conseqüentemente, as substâncias presentes também são ingeridas, criando a possibilidade de ingestão de nutrientes exógenos antes do nascimento. A inoculação *in ovo* na cavidade amniótica, permite a ingestão oral de nutrientes antes mesmo da eclosão (FOYE, 2005; OLIVEIRA et al., 2014).

Muito embora o consumo do líquido amniótico comece aproximadamente no 15º dia de incubação, a inoculação de nutrientes *in ovo* deve ser realizada por volta do 17º, 18º ou 19º dia de incubação, momento em que o embrião apresenta maior desenvolvimento intestinal (DOS SANTOS et al., 2010; CAMPOS; GOMES; ROSTAGNO, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014). No entanto, não há definição ainda da melhor idade para ocorrer a inoculação *in ovo* de nutrientes.

A introdução de nutrientes em ovos embrionados por injeção durante o período de incubação não é uma técnica recente. Couch e colaboradores, em 1948, administraram biotina via injetável, no período entre 72 e 96 horas, em ovos férteis produzidos por aves com dietas deficientes e observaram a produção de embriões saudáveis (VIEIRA, 2007). Todavia, a administração de substâncias em ovos embrionados ganhou maior viabilidade pela técnica (máquina) de aplicação de vacinas, que tem por objetivo a imunização das aves antes do nascimento (FERKET et al., 2005). Desta forma, o interesse de associar a inoculação de nutrientes ou aditivos às vacinas durante a transferência da incubadora ao nascedouro tem aumentado (CAMPOS et al., 2011). No período da incubadora ao nascedouro, os embriões ingerem líquido amniótico, o que possibilita a introdução de nutrientes específicos que, por meio do contato com os enterócitos, direciona sua diferenciação celular (VIEIRA, 2007). Isso é especialmente importante, quando se considera o curto período pós-eclosão de um frango e o expressivo aumento de até 50 vezes o peso corporal na eclosão até idade de abate. Dessa forma, os primeiros dias pós-eclosão são críticos para ajuste da qualidade esperada na produção avícola. Daí,

porque os métodos de nutrição precoce têm grande impacto no crescimento geral e bem-estar da ave, particularmente para acompanhar o ritmo acelerado de ganho de peso e considerando que a seleção genética é contínua (UNI e FERKET, 2004).

A inoculação de nutrientes *in ovo* pode ainda aumentar o número de células caliciformes, produtoras de muco (FERKET e UNI, 2006), estimular o precoce desenvolvimento da ave, que ocorreria só depois da eclosão; proporcionar menor incidência de distúrbios esqueléticos (FOYE et al., 2006), promover a eficiência digestiva, propiciar maior desenvolvimento muscular e reduzir a ocorrência de problemas sanitários e mortalidade pós-eclosão (UNI e FERKET, 2004; FURLAN; MACARI e LUQUETTI, 2004; CAMPOS et al., 2010).

A administração de nutrientes em âmnios via injeção *in ovo* conduz a um estímulo no desempenho intestinal das aves, o que gera aumento no comprimento dos vilos e na capacidade intestinal para digerir dissacarídeos (TAKO, FERKET e UNI, 2004). A inoculação do probiótico no líquido amniótico permite a colonização benéfica antes da eclosão (PESSÔA et al., 2012). A utilização dessa técnica de inoculação precoce de probiótico pode trazer vantagens sobre as demais porque garante o contato das bactérias benéficas com o TGI das aves antes que ocorra a eclosão e porque oportuniza o primeiro contato da ave com bactérias presentes no ambiente (NISBET et al., 1994; VIEIRA, 2007).

Entretanto, na literatura, ainda se discutem os benefícios proporcionados pela inoculação embrionária de probióticos, uma vez que ainda pouco se sabe acerca dos níveis e tipos de nutrientes que podem ser utilizados com sucesso (OLIVEIRA et al., 2014). Não raro, os níveis e a composição dos nutrientes inoculados *in ovo* são omitidos nas pesquisas. Nessa perspectiva, a obtenção de respostas positivas não só depende da composição da solução, mas também da osmolaridade e do volume da solução injetada no ovo (CAMPOS; GOMES; ROSTAGNO, 2010).

Sabe-se, ainda, que a alta concentração de nutrientes na solução pode causar desequilíbrio osmótico e resultar no óbito do embrião e que a osmolaridade de soluções nutritivas a serem inoculadas *in ovo*, a base de carboidratos, devem ser mantidas entre 300 a 650 mOsm para não haver desequilíbrio e, conseqüentemente, morte do embrião (FERKET, 2005; CAMPOS et al., 2010).

Gonzales (2004) afirmou que a inoculação de probiótico colonizadores é viável em ovos embrionados e pode ser usada para promover a colonização entérica

do trato gastrointestinal das aves o mais cedo possível. Cruz et al. (2003) observaram que a inoculação de probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos *in ovo*, não prejudicou a eclosão de pintos de corte.

Oliveira et al. (2014) encontraram uma redução significativa no número de pintos positivos para *Salmonella enteritidis* quando os ovos embrionados foram inoculados com *Enterococcus Faecium*, entretanto os pintos continuaram recebendo o probiótico na dieta.

A aplicação de probiótico por pulverização ou via *spray* tem sido indicada por fabricantes comerciais de probióticos. Essa técnica tem alta viabilidade devido ao grande número de pintos que pode ser vacinado, por já ser utilizada na rotina do incubatório na vacinação de doenças respiratórias e permitir, a exemplo da inoculação *in ovo*, colonizar precocemente o TGI das aves antes do alojamento (SCHNEITZ et al., 1992; WOLFENDEN et al., 2007). Casas, Edens e Parkhurst (1994) relataram que frangos de corte que receberam probiótico *in ovo* ou *spray* apresentaram maior viabilidade quando desafiados por *Salmonella typhimurium*.

A administração de probióticos no incubatório pode ser uma maneira mais eficaz para a colonização do TGI porque os pintos receberão as bactérias benéficas precocemente. Vacinas, nutrientes, prebióticos, probióticos e outros componentes podem ser combinados em um único procedimento e garantir o fornecimento individual e preciso de um “pacote de boas ferramentas”.

2.2.3 Administração de Probióticos Pós-Eclosão – estratégia à recolonização

Dentre as metodologias de administração dos probióticos, a adição dos produtos à ração, como componente da dieta nutricional da ave, ainda, é a mais comumente usada na produção avícola em escala comercial.

O uso de probióticos como aditivos na dieta nutricional de frangos de corte podem proporcionar melhor desempenho, mas alcançar o desejado depende de vários fatores, dentre os quais o tipo de probiótico e cepas usadas, a viabilidade de agregação do microrganismo à ração, condições de armazenamento e de manejo (nível de estresse) e sanidade das aves (FURLAN; MACARI e LUQUETTI, 2004; FERREIRA e KUSSUKAWA, 2008).

Na avicultura de corte, espera-se que a ave alcance aproveitamento máximo dos alimentos para produzir maior quantidade de carne, sem maior consumo de

ração até atingir a idade de abate, até porque menor consumo de ração gera menor quantidade de dejetos, o que, em consequência, tem potencial para garantir menor nível de contaminação na cama do aviário por microrganismos patogênicos (DE LOS SANTOS, RODRIGO e GIL-TURNES, 2005; PESSÔA et al., 2012).

Os produtos probióticos de tipo nutricional, isto é, aqueles formulados para inclusão na ração peletizada que se destina à alimentação de frangos de corte, podem resultar em índices insatisfatórios no desempenho das aves (LIMA, PIZAURO JÚNIOR e MACARI, 2003). Uma das razões para a ineficácia pode residir na escolha dos produtos, cujas bactérias probióticas incorporadas à ração, eventualmente, revelem baixo potencial de sobrevivência durante o tempo de exposição no comedouro e/ou no armazenamento do produto (LIMA, PIZAURO JÚNIOR e MACARI, 2003). Por outro lado, a opção por estirpes benéficas formadoras de esporos pode ser a melhor solução natural para o desafio da estabilidade de produtos microbianos suplementados nas dietas (EZEMA, 2013).

A eficácia dos probióticos também depende da concentração bacteriana na ração, sanidade das aves, práticas de manejo no alojamento (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004) e da qualidade dos pintinhos que chegam aos aviários comerciais. Dependendo da gravidade desses fatores, o desenvolvimento da mucosa intestinal pode ser afetado, seguido de perda de peso corporal, pela suspensão das dietas alimentar e hídrica durante o tempo de permanência em caixas de transporte até o alojamento (NOY, GEYRA e SKLAN, 2001).

A suplementação de probiótico nas rações tem resultado em bons índices de desempenho, especialmente na fase entre 1-21 dias de idade (CORRÊA et al., 2003; SILVA et al., 2011). Alguns trabalhos também mostram que a administração de probióticos via ração melhorou o comprimento de vilos e profundidade da cripta (DOBROGOSZ, BLACK e CASAS, 1991).

Blair et al. (2004) demonstraram que não houve diferença nos índices zootécnicos de perus tratados com probiótico a base de *B. subtilis* ou com o antimicrobiano bacitracina de zinco. No entanto, observaram um efeito benéfico do *B. subtilis* sob a volatilização de amônia da cama.

Andreatti Filho et al. (2007) utilizaram microbiota cecal cultivada em aerobiose em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis e verificaram menor colonização pelo patógeno nos grupos tratados, demonstrando o efeito protetor de bactérias da microbiota de aves adultas administradas em pintos recém eclodidos.

Lourenço et al. (2013) avaliaram um probiótico elaborado com cepas mistas de *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum* em aves inoculadas com *Salmonella Minnesota* aos 14 dias de idade sobre a quantificação de células caliciformes e linfócitos T na mucosa do íleo e ceco. Pesquisadores obtiveram resultados positivos quanto aos parâmetros avaliados e constataram que a contagem de *Salmonella* spp. nas fezes das aves avaliadas foi significativamente reduzida.

Na inclusão de probiótico com cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* na dieta de frangos, Ahmed et al. (2014) observaram melhora do desempenho, elevação no título de imunoglobulinas séricas e redução na contagem de *Escherichia coli* fecal. Lei et al. (2015) avaliaram a mesma cepa em dietas de frangos de corte fornecidas a partir de 22 dias de idade e demonstraram que os grupos que receberam o probiótico apresentaram maior digestibilidade de nutrientes e melhora da saúde intestinal das aves devido ao maior comprimento de vilos.

Além da administração de probióticos pela ração, a via hídrica é outra possibilidade de manter a colonização entérica em frangos de corte. Todavia, na literatura se encontram poucos resultados relatados bastante controversos. Em comum, esses trabalhos relatam a importância da potabilidade da água, pureza e ausência de produtos químicos para garantir a sobrevivência das bactérias probióticas em bebedouros (SEUNA, RAEVUORI e NURMI, 1978; TIMMERMAN et al., 2006; OLNOOD et al., 2015).

Contudo, alguns trabalhos mostram que a administração de probiótico via água potável revela resultados superiores à suplementação na ração de frangos de corte (TIMMERMAN et al., 2006; OLNOOD et al., 2015). No entanto, a administração concomitante de probióticos via água e via ração também se mostra efetiva na criação industrial de frangos de corte (PELICANO et al., 2003).

REFERÊNCIAS

AHMED, S. T. et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p. 1963-71, 2014.

- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, n. 7, p. 1093-8, 2004.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 91-5, 2006.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. In: _____. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo, SP: Rocca Ltda, 2007, cap. 6, p. 41-51.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 3, p. 59-71, 1999.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênica e apatogênica de *Escherichia Coli* em galinha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 475-86, 1993.
- APAJALAHTI, J., KETTUNES, A., GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 2, p. 223-32, 2004
- BARROS, M. R. et al. Transference in vitro of the resistance to the antimicrobials between *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella* enteritidis isolated from chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p.1149-53, 2009.
- BLAIR, E. C. et al. Effects of Calsporin® on turkey performance, carcass yield and nitrogen reduction. **International Journal of Poultry Science**. v. 3 n.1, p 75-79, 2004.
- BOLDUAN, G. Feeding weaner pigs without feed antibiotics. **Biotechnology in the feed industry**. Nottingham University Press, p. 223-30,1999.
- BORTOLUZZI, C. **Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulos*) após desafio com *Eimeria acervulina* e *E. tenella***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP: USP, 2013.
- CAMPOS, A. M. A. C. **Efeito da inoculação in ovo de soluções nutritivas sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia da Universidade de Viçosa. Viçosa, MG: UFV, 2007.
- CAMPOS, A. M. A. et al. Effect of in ovo inoculation of nutritious solutions on the hatchability and performance of broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1712-17, 2011.
- CAMPOS, A. M. A.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S. Nutrição in ovo de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**. Artigo 119, v. 7, n. 4, p.1304-13, 2010.
- CASAS, I. A.; EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R. Control of *Salmonella typhimurium* GI tract infection by GaiaFeed® and Gaiafeed® in presence of *Staphylococcus*. **Poultry Science**, v. 74 (Supplement 1), p.130, 1994.

- CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159-61, 2003.
- CASULA, G.; CUTTING, S. M. Bacillus probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2344-52, 2002.
- COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, n. 6, p. 274, 2011.
- COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
- CORRÊA, G. S. S. et al. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 467-73, 2003.
- COUCH, J. R. et al. Studies on the role of biotin in embryonic development of the domestic fowl. **Poultry Science**, v. 27, p. 657, 1948.
- CRESSMAN, M. D. et al. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6572-82 2010.
- CRUZ, C. P. et al. Aplicação de probiótico em ovos embrionados de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Suplemento 5, p.12, 2003.
- CUKROWSKA, B. et al. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 2, p. 204-9, 2002.
- CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-20, 2011.
- DE LOS SANTOS, G. I. L.; RODRIGO, J.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-47, 2005.
- DE OLIVEIRA, J. E. et al. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch Salmonella susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 818-29, 2014.
- DEEMING, D. C. Yolk sac, body dimensions and hatchling quality of ducklings, chicks and poults. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 560-564, 2005.
- DOBROGOSZ, W. J.; BLACK B. L.; CASAS I. A. Delivery of viable Lactobacillus reuteri to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 70, p. 158, 1991.
- DOS SANTOS, T. T. et al. Influence of in ovo inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2010.
- ESTRADA, M. A. J; HERNÁNDEZ, J. A. M.; SOTO, L. G. Un probiótico definido aumenta la exclusión de Salmonella enterica serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras. **Veterinaria México**, v. 41, n. 1, p. 25-43, 2010.
- EZEMA, C. Probiotics in animal production: a review. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 5, n. 11, p. 308-16, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. **Animal Production and Health Paper**, n. 179. Rome, Italy: Editor Harinder P.S. Makkar, 2016.

FARIA FILHO, D. E. et al. Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 2, p. 89-98, 2006.

FARIA, D. E. et al. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, 2009.

FERREIRA, F. A. B.; KUSSUKAWA, K. C. K. Uso de probiótico na alimentação de frango de corte. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p.40-43 2008.

FERKET, P., UNI, Z. Early feeding in-ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: **Anais**. Conference European Poultry 12th, Verona. Conference European Poultry, 2006 (CD-ROM).

FERKET, P. et al. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. In: **Poultry Science**, v. 84, p. 118-9, 2005.

FLINT, J. F.; GARNER, M. R. Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 2, p. 367-78, 2009.

FOYE, O. T.; FERKET, P.; UNI, Z. The effects of in ovo feeding arginine, β -hydroxy- β -methyl-butyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2343-49, 2007.

FOYE, O. T.; UNI, Z.; FERKET, P.; Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-92, 2006.

FOYE, O. T.; BLACK, B. L. Intestinal adaptation to diet in the young domestic and wild turkey (*Meleagris gallopavo*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 143, n. 2, p. 184-92, 2006.

FOYE, O. T. **The biochemical and molecular effects of amnionic nutrient administration,"in ovo feeding" on intestinal development and function and carbohydrate metabolism in turkey embryos and poults**. Dissertation (Doctorate of Philosophy in Nutrition). Faculty of North Carolina State University. Raleigh, CN, USA, 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **Anais**. V Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição. Balneário Camboriú, SC, 2004.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141 Suppl 1, n. p. S15-28, 2010.

- GOMES, A. M. P; MALCATA, F. X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 1998.
- GONÇALVES, F. M. et al. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 54-5, 2013.
- GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ UNESP, 2004.
- GREEN, D. H. et al. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p.4288-91, 1999.
- GUARNER, F. et al. Probióticos y prebióticos. In: **Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: probióticos y prebióticos**, p. 1-29, 2011.
- GUSILS, C.; GONZÁLEZ, S.; OLIVER, G. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. **Canadian Journal Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 981-87, 1999.
- HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-56, 1992.
- HASHEMZADEH, Z. et al. Prevention of Salmonella colonization in neonatal broiler chicks by using different routes of probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 12, p. 425-32, 2010.
- HINTON, M.; MEAD, G. C. Salmonella control in poultry: the need for the satisfactory evaluation of probiotics for this purpose. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 49-50, 1991.
- ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Aviagen Brasil**. 2007. Disponível em: <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/novembro2007-saudeintestinalemfrangosdecorte.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- KONEMANN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ: MEDSI, 2001.
- KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probiotics on poultry production. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1457-65, 2014.
- LAN, Y. et al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, n. 1, p. 95-104, 2005.
- LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 219-25, 2010.
- LEAHY, S. C. et al. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1303-15, 2005.
- LEDUR, M. C.; BERTANI, G. R.; NONES, K; Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. In: **Anais**. Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. Campinas, SP: APINCO, 2003, p. 87-105.
- LEI, X. et al. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler

chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** (AJAS), v. 28, n. 2, p. 239-46, 2015.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-8, 1965.

LIMA, A. C. F.; PIZAURO JÚNIOR, J. M.; MACARI, M. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 200-7, 2003.

LINZMEIER, L. G. et al. Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, a. VII, n. 12, 2009.

LODDI, M. M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p.1124-31, 2000.

LODDI, M. M. **Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico em dietas para frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, 2003.

LOURENÇO, M. C. et al. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 11-4, 2013.

LU, J. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6816-24, 2003.

MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal das aves. In: MACARI, M. et al. Produção de frangos de corte. **Aves domésticas – produção de frangos de corte**. 2. ed. Campinas: Facta, 2014, p. 299-320.

MARGOT, P.; KARAMATA, D. The wprA gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. **Microbiology**, v. 142, n. 12, p. 3437-44, 1996.

MATTAR, A. et al. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a caco-2 cell-culture model. **Pediatric Surgery International**. Ann Arbor, v. 18, n. 7, p. 586-90, 2002.

MENTEN, J. F. M.; LODDI, M. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. **Anais**. Simpósio Sobre Ingredientes na Alimentação Animal. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. Campinas, SP, v. 2, p. 251-76, 2002.

MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. **Anais**. Conferência da Facta. Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. Santos, SP, p. 47-53, 2005.

MILLS, T. K.; LOMBARDO, M. P.; THORPE, P. A. Microbial colonization of the cloacae of nestling tree swallows. **The Auk**, p. 947-56, 1999.

MORAN, E. T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1043-49, 2007.

NISBET, D. J. et al. Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 1, p. 12-5, 1994.

NOY, Y.; GEYRA, A.; SKLAN, D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. **Poultry Science**, v. 80, n. 7, p. 912-9, 2001.

OLIVEIRA, J. E. et al. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch Salmonella susceptibility. **Poultry science**, v. 93, n. 4, p. 818-29, 2014.

OLNOOD, C. G. et al. Delivery routes for probiotics: Effects on broiler performance, intestinal morphology and gut microflora. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 192-202, 2015.

OTUTUMI, L. K. et al. Variations on the efficacy of probiotics in poultry. **INTECH Open Access Publisher**, p. 203-39, 2012.

OTUTUMI, L. K. et al. Different ways of administering probiotic on performance, yield carcass and small intestine microbial population of meat quail. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 158-164, 2010.

OVIEDO-RONDON, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 209-25, 2009.

PANDA, A. K.; REDDY, M. R.; PRAHARAJ, N .K. Dietary supplementation of probiotic on growth, serum cholesterol and gut microflora of broilers. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 235-40, 2006.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with hos and diet. **Gut Microbe**, v. 5, n. 1, p. 108-19, 2014.

PELICANO, E. R. L. et al. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 5, n. 3, p. 207-214, 2003.

PESSÔA, G. B. S. et al. New concepts in poultry nutrition. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 755-74, 2012.

PEDROSO, A. A. Microbiota do trato digestório: transição do embrião ao abate. In: **Anais**. Conferência Apinco Facta, 2011, Santos. São Paulo, p. 123-30, 2011.

PEDROSO, A. A. et al. Remodeling the intestinalecosystem toward better performance andintestinal health. **The Journal of Applied Poutry Research**, v. 21, p. 432-4, 2012.

RAMOS, L. S. N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frangos de corte**. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Teresina, PI, 2009.

RINTTILÄ, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 647-58, 2013.

ROSA, G. J. de M.; ROCHA, L. B. da; FURLAN, L. R. Microarray gene expression studies: experimental design, statistical data analysis, and applications in livestock research. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 186-209, 2007.

ROSTAGNO, H. S. et al. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**, v. 2, 2005.

ROTO, S. M.; KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. **Frontiers in veterinary science**, v. 3, 2016.

SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics: a review. **International journal of food microbiology**, v. 44, n. 1, p. 93-106, 1998.

SANTOS, E. **Aditivos alternativos ao uso de antibiótico na alimentação de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2003.

SANTOS, M. J. B. et al. Manejo e tratamento de cama durante a criação de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, Artigo 164, v. 9, n. 3 p. 1801-15, 2012.

SCHNEITZ, C. et al. Droplet application for protecting chicks against Salmonella colonisation by competitive exclusion. **Veterinary Record**, v. 126, n. 20, p.510, 1990.

SCHNEITZ, C. et al. Competitive exclusion in the young bird: challenge models, administration and reciprocal protection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 3-4, p. 241-44, 1992.

SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Science**, v. 71, n. 12, p. 2125-8, 1992.

SEUNA, E.; RAEVUORI, M.; NURMI, E. An epizootic of Salmonella typhimurium var. copenhagen in broilers and the use of cultured chicken intestinal flora for its control. **British Poultry Science**, v. 19, n. 3, p. 309-314, 1978.

SILVA, W. T. M. et al. Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, PR, v. 33, n. 1, p.19-24, 2011.

SKLAN, D.; GEYRA, A.; TAKO, E. et al. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 747-53, 2003.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The genus bacillus-nonmedical. **Prokaryotes**, v. 4, p. 530-62. 2006. Chapter 1.1.16.

STERZO, E. V. et al. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control Salmonella enterica serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n.1 p. 69-73, 2007.

TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 2023-8, 2004.

TEO, A.; TAN, H. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with Bacillus subtilis PB6 (CloSTAT). **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 3, p. 296-303, 2007.

TIMMERMAN, H. M. et al. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. **Poultry Science**, v. 85, n. 8, p. 1383-88, 2006.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 1, p. 101-11, 2004.

- VAN DER HOEVEN-HANGOOR, E. et al. Moisture content in broiler excreta is influenced by excreta nutrient contents. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 12, p. 5705-13, 2013.
- VIEIRA, S. L. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2007.
- WANG, L.; LILBURN, M.; YU, Z. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 593, 2016.
- WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1694, n. 1, p. 299-310, 2004.
- WOLFENDEN, A. D. et al. Evaluation of spray application of a Lactobacillus-based probiotic on Salmonella enteritidis colonization in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 493-96, 2007.
- WONG, S. L.; YE, R.; NATHOO, S. Engineering and production of streptokinase in a Bacillus subtilis expression-secretion system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 517-23, 1994.
- WU, X.C. et al. Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered Bacillus subtilis expression-secretion system. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 1, p. 71-6, 1993.
- YANG, M. J. et al. Expression of a Bacillus subtilis endoglucanase in protease-deficient Bacillus subtilis strains. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 430-34, 2004.
- YE, R. et al. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from Bacillus subtilis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 87-96, 1999.
- YIN, Y. et al. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **Isme Journal**, v. 4, p. 367-76, 2010.
- ZHOU, M. et al. Effects of Bacillus licheniformis on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 48, 2016.
- ZHU, X. Y. et al. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the caecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p.124-37, 2002.
- ZOCCO, M. A. et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 8, p. 707-12, 2007.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade intestinal e o desempenho produtivo de frangos de corte suplementados com probiótico à base do *Bacillus subtilis* sob diferentes vias de administração.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da aplicação *in ovo*, pulverização das aves pós-eclosão e ingestão via ração de probiótico comercial em condições sanitárias de criação e em condições de alto desafio sanitário sobre:

- peso corporal médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar;
- medidas morfométricas do intestino;
- condição inflamatória da mucosa intestinal do duodeno, íleo e jejuno;
- microbiota intestinal.

CAPÍTULO I – DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE 1 A 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS AO DESAFIO SANITÁRIO

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as diferentes formas de administração de probiótico à base de *Bacillus subtilis* sobre o desempenho produtivo e saúde intestinal de frangos de corte de um a vinte e um dias (1-21d) de idade submetidos ao desafio sanitário. Foram alojados 640 pintos, machos, linhagem *Cobb*, em um delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 4 x 2 (4 formas de administração: dieta isenta de probiótico (controle negativo), probiótico *in ovo*, probiótico via spray pós-eclosão e probiótico na ração vs 2 condições sanitárias), obtendo-se oito dietas, oito repetições com dez aves por gaiola, totalizando 64 unidades experimentais. A inoculação de probiótico *in ovo* à base de *Bacillus subtilis* não interferiu com a eclodibilidade e mortalidade embrionária. A inoculação de probiótico *in ovo* a base de *Bacillus subtilis* e a suplementação na ração resultaram no melhor desempenho produtivo na fase inicial de um a vinte e um dias (1-21d) de idade dos frangos de corte em relação a uma dieta isenta de probiótico a aplicação por spray. As diferentes formas de administração de probiótico alteraram principalmente a morfometria do duodeno e mostraram relação com os resultados obtidos para o desempenho produtivo. As lesões macroscópicas observadas na mucosa intestinal foram mais intensas quando a dieta utilizada não continha probiótico e as aves submetidas ao desafio sanitário. Os resultados indicam que, consideradas as condições do desafio e do delineamento experimental, o uso de probiótico elaborado à base de esporos do *Bacillus subtilis* pode contribuir para a manutenção da saúde e favorecer o desempenho produtivo dos frangos de corte.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, ganho de peso, morfometria intestinal, muco.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the different forms of probiotic administration based on *Bacillus subtilis* on the productive performance and intestinal health of broiler chickens from 1 to 21 days of age submitted to the sanitary challenge. A total of 640 male, *Cobb* lineage chicks were housed in a completely randomized design, 4 x 2 factorial scheme (4 administration forms: probiotic-free diet (negative control), probiotic *in ovo*, post-hatch probiotic spray and probiotic in ration Vs 2 sanitary conditions), obtaining 8 diets, 8 replicates in 10 birds per cage, totaling 64 units. Inoculation of probiotic *in ovo* on the basis of *Bacillus subtilis* did not interfere with hatchability and embryonic mortality. Inoculation of probiotic *in ovo* based on *Bacillus subtilis* and feed supplementation resulted in the best productive performance at the initial stage of 1 to 21 days of age of broiler chickens relative to a spray-free probiotic-free diet. The different forms of probiotic administration mainly altered the morphometry of the duodenum and showed a relation with the results obtained for the productive performance. The macroscopic lesions observed in the intestinal mucosa were more intense when the diet used did not contain probiotic and the birds submitted to the sanitary challenge. The results indicate that, considering

the challenge conditions and the experimental design, the use of probiotics based on *Bacillus subtilis* spores can contribute to the maintenance of health and favor the productive performance of broilers.

Key words: *Bacillus subtilis*, weight gain, intestinal morphometry, mucus.

1 INTRODUÇÃO

A alta frequência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, assim como o aumento da resistência aos antimicrobianos utilizados como suplementos alimentares, levaram ao questionamento a respeito do uso indiscriminado de antimicrobianos como aditivos em rações animais, dando sustentação às recomendações do Comitê Swann, Grã Bretanha (SWANN, 1969) e culminando com a proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais pela União Europeia a partir de 2006 (EC, 2003; SANTOS e GIL-TURNES, 2005).

A crescente proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento (APC) nas dietas dos frangos de corte leva a se questionar sobre a possibilidade de haver produção de alimentos em quantidade suficiente para todos devido à perda em produtividade decorrente do banimento desses aditivos. A missão de garantir a produção de alimentos capaz de alimentar 9 a 12 bilhões de habitantes dependerá da utilização máxima de recursos tecnológicos capazes de aumentar a produtividade e eficiência dos modernos empreendimentos de produção de alimentos.

Além do maior investimento em biossegurança, uma alternativa que aponta resultados favoráveis é a colonização intencional da microbiota com bactérias probióticas (CUKROWSKA et al., 2002), que promovem a eliminação de bactérias patogênicas sem eliminar as populações benéficas ou gerar resistência bacteriana no organismo dos frangos de corte (LINZMEIER et al., 2009; COGLIANI; GOOSSENS e GREKO., 2011).

Os probióticos são aditivos constituídos por microrganismos vivos e que quando administrados em quantidade adequada junto à alimentação animal, trazem benefício à saúde intestinal por meio da modulação de sua microbiota (FULLER, 1989). A eficácia do probiótico é estritamente dependente da quantidade e de características das cepas dos microrganismos usado na elaboração do aditivo (JIN et al., 1997; SANTOS e GIL-TURNES, 2005; OHLAND e MACNAUGHTON, 2010).

Independentemente do conceito usado, os probióticos trazem benefícios à saúde do hospedeiro, não deixam resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem resistência às drogas (SILVA e ANDREATTI FILHO, 2000), o que os torna preferenciais para substituir os antimicrobianos como aditivos alimentares.

Os esporos bacterianos, principalmente do gênero *Bacillus*, são comumente encontrados em formulações probióticas disponíveis para uso em frangos de corte por serem idealmente adequados pela capacidade de sobrevivência em condições ambientais adversas e por longo prazo de armazenamento (FULLER, 1989).

O *Bacillus subtilis*, de interesse nesse estudo, pertence ao gênero de bactérias formadoras de esporo que mostram eficiente ação como agentes de biocontrole microbiano (LIMA, PIZAURO JÚNIOR e MACARI, 2003; CAWOY et al., 2015). Pela robustez natural, os esporos desse *Bacillus* são bastante versáteis às formas de administração na dieta animal (FULLER, 1989), atravessam o ambiente gástrico ácido gerado pela colonização de espécie hospedeira indesejada e entram no intestino delgado em estado salutar, capazes de inibir infecções gastrointestinais, promover imunomodulação e síntese de antimicrobianos (HONG et al., 2005).

Estudos controlados mostraram que a administração oral de esporos de *Bacillus subtilis* em frangos de corte reduziu a infecção por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (CUTTING, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2014).

A colonização intencional da microbiota com bactérias probióticas deve ser feita o quanto mais cedo possível para evitar a colonização inicial da microbiota entérica dos pintos no pós-eclosão por microrganismos patogênicos. (LINZMEIER et al., 2009) Nesse sentido, é possível o fornecimento de microrganismos em ovos embrionados durante o período de incubação (FOYE et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2014), assim como depois da eclosão, ainda no incubatório por meio da aplicação do probiótico por *spray*, ou no galpão adicionado à ração e água, de forma contínua (SANTOS e GIL-TURNES, 2005; FERREIRA e KUSSUKAWA, 2008).

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar as diferentes formas de administração de probiótico à base do *Bacillus subtilis* sobre o desempenho produtivo e a saúde intestinal de frangos de corte de um a vinte e um dias (1-21d) de idade submetidos a desafio sanitário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no biotério de aves da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina e no incubatório de uma Agroindústria da região Oeste do Paraná. Todos os procedimentos com uso de animais neste trabalho foram submetidos à avaliação e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR – Setor Palotina (Protocolo 39/2016).

Foram utilizados 640 pintos machos de 1 dia de idade, da linhagem *Cobb* 500, provenientes de matrizes de 37 semanas de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (controle + 3 formas de administração do probiótico vs com e sem desafio), obtendo-se oito tratamentos com oito repetições e dez aves por unidade experimental. As dietas experimentais (TABELA 1).

TABELA 1 - DIETAS EXPERIMENTAIS

Grupo	Identificação do Tratamento	Especificação do Tratamento
Não Desafiado	Dieta 1	Dieta isenta de probiótico (controle negativo)
	Dieta 2	Probiótico <i>in ovo</i>
	Dieta 3	Probiótico via spray pós-eclosão
	Dieta 4	Probiótico na ração
Desafiado	Dieta 5	Dieta isenta de probiótico
	Dieta 6	Probiótico <i>in ovo</i>
	Dieta 7	Probiótico via spray pós-eclosão
	Dieta 8	Probiótico na ração

FONTE: A Autora (2017).

O probiótico continha *Bacillus subtilis* 10⁹ UFC/g e foi utilizado segundo a recomendação do fabricante.

No incubatório da Agroindústria, no 18^o dia de incubação, um carrinho de incubação contendo 15 andares (168 ovos/andar) foi levado para a máquina de vacinação *in ovo* e em cada ovo foi injetado 0,5mL de solução (0,05g probiótico + diluente). Uma amostra dessa solução foi coletada para realização da análise de quantificação de *Bacillus spp.* inoculado *in ovo*, onde foi encontrado 10⁷ UFC/g de *Bacillus subtilis*. Os ovos devidamente identificados foram transferidos para as bandejas do nascedouro e permaneceram ali juntamente com os demais ovos até a eclosão aos 21 dias. Após a eclosão desses ovos inoculados, os pintos foram sexados e classificados em 160 pintos machos. Para seguir o experimento, os

demais ovos eclodidos e, portanto, que não tenham sido inoculados, foram selecionados e sexados mais 160 pintos, os quais foram submetidos à aspersão de 0,05g probiótico + diluente por meio do equipamento utilizado para vacinas contra doenças respiratórias. Outros 320 pintos foram também sexados e juntamente com os demais transferidos para o biotério de aves da UFPR – Setor Palotina.

A dieta basal (TABELA 2) foi elaborada à base de milho, farelo de soja e farinha de carne, formulada conforme valores de composição química dos alimentos e de maneira a atender os requerimentos nutricionais das aves e as recomendações nutricionais adotadas pelas integrações avícolas da região (ROSTAGNO et al., 2011).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA EXPERIMENTAL DOS FRANGOS

Ingredientes (%)	Período de 1-21 dias de vida
Milho	53,07
Farelo de soja	34,00
Farinha de carne	5,20
Óleo de soja	4,10
Farinha de vísceras	1,50
Calcário	0,340
Sal comum	0,310
Bicarbonato de sódio	0,103
Colina 60%	0,086
L-Lisina 70%	0,316
L-Treonina 98%	0,092
L-Valina	0,021
Composição nutricional	Valores calculados (100%)
Energia metabolizável (kcal/kg)	3050
Proteína bruta (%)	21,90
Cálcio (Ca %)	0,908
Fósforo disponível (P%)	0,454
Arginina digestível (%)	1,415
Glicina + Serina total (%)	2000
Isoleucina digestível	0,873
Lisina digestível (%)	1170
Mitionina digestível	0,556
Met + Cist. Digestível	0,850
Treonina digestível	0,770
Triptofano digestível	0,246
Valina digestível	0,925

¹ Nível por kg de premix inicial: Vitamina A (KUI/KG 4,000,00); Vitamina D3(KUI/KG 1,167,000); Vitamina E (UI/KG 10,000,00) Vitamina K3 (mg/kg 1,000,00); Vitamina B1-Tiamina (mg/kg 1,000,00); Vitamina B2 – Riboflavina (mg/kg 2,666,666); Vitamina B6 – Piridoxina (mg/kg 1,667,00); Vitamina B12 – Cianocobalamina (mg/kg 6,666,00); Acido Pantatênico (mg/kg 6,000,00) Niacina (mg/kg 13,000,00); Ácido Fólico (mg/kg 833,33); Biotina (mcg/kg 80,000,00); Manganês (ppm 40,000,00); Zinco (ppm 33,333,33); Ferro (ppm 23,333,00); Cobre (ppm 2,666,67); Iodo (ppm 333,33); Selênio (ppm 80,00); Etoxiquina (mg/Kg 22,200,00); Fitase Phyzyme (g/kg 16,667); AXTRA XAP 101 TPT (g/kg 33,333,00).

FONTE: A Autora (2017).

As aves do grupo controle (isento de probiótico) e que receberam o probiótico *in ovo* ou via *spray* foram alimentadas durante todo o período experimental com a dieta basal (isenta de APC ou probiótico). A dieta basal foi suplementada com probiótico (150g/t.) e fornecida às aves do tratamento contendo probiótico na ração. O desafio experimental foi promovido por meio da utilização de cama descartada de um aviário comercial, associada com ocorrência de enterites inespecíficas. Nas demais gaiolas foi utilizada maravalha nova. O manejo das aves era iniciado pelas aves do grupo controle e, em seguida, eram manejadas as aves desafiadas procurando evitar a contaminação entre os grupos.

O ambiente de criação das aves consistia em uma sala climatizada (ar condicionado e exaustores), com oito baterias de gaiolas, cada uma composta por oito gaiolas (0,55 x 0,80m), totalizando 64 unidades experimentais. A temperatura de conforto térmico foi regulada de acordo com a idade das aves. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período do ensaio.

Para avaliação do desempenho produtivo (peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar), as aves e as sobras de ração de cada unidade experimental foram pesadas aos 7 dias e ao final do período de experimento (21 dias de idade das aves). A conversão alimentar foi corrigida pela mortalidade semanal das aves conforme metodologia descrita por Sakomura e Rostagno (2007).

Aos 21 dias de idade, duas aves/repetição (16 aves/tratamento) foram sacrificadas e obtidos fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento do duodeno, jejuno e íleo, os quais foram presos e abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de formol tamponado e após emblocadas em parafina. Cada fragmento foi submetido a cortes semisseriados de 5 μ m de espessura e corados por Hematoxilina e Eosina.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (objetiva 10x), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética).

Nesse estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos, a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina, a espessura da camada muscular em aproximadamente 10 pontos distintos da lâmina e contabilizado o número de criptas em 20 vilos. As medidas morfométricas utilizadas para o cálculo

da área da superfície de absorção da mucosa intestinal ocorreram pela alicação da fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002).

$$\text{Área de absorção: } \frac{(LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2}{(LV/2 + LC/2)^2}$$

Onde: LV: largura de vilo, AV: altura de vilo, LC: largura de cripta

Para a análise macroscópica do íleo utilizou-se a metodologia de Bracarense et al. (2012) modificada. A avaliação macroscópica foi realizada no momento da coleta. Para cada alteração macroscópica observada na mucosa intestinal das aves, foi atribuído um grau de severidade (GS) entre 0 e 3, sendo grau 0: sem alteração, grau 1: alteração leve, grau 2: alteração moderada e grau 3: alteração severa, de acordo com a sua importância em reduzir a capacidade funcional do órgão, ou seja, digestão e absorção de alimentos. Para cada alteração observada foram atribuídos escores de 0 a 3 conforme a intensidade da lesão, escore 0 sem lesão, escore 1 é baixa extensão (25%), escore 2 é média extensão (50%), e escore 3 é grande extensão (75%). Os valores de escores de intensidade foram multiplicados pelo GS, estabelecendo um valor total de alterações visualizadas na mucosa de cada segmento intestinal.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento GLM do programa SAS (SAS *Institute*, 2002), ao nível de 5% de significância. Para os resultados obtidos na análise macroscópica da condição inflamatória intestinal foi utilizado o teste de KRUSKAL e WALLIS (1952).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de eclodibilidade dos ovos selecionados que receberam ou não o probiótico antes da eclosão, assim como os percentuais de aves mortas e eliminadas (TABELA 3).

Na comparação com o controle, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual médio de eclodibilidade e mortalidade embrionária pela inoculação de probiótico *in ovo*. Esses resultados são indicativos de que a inoculação *in ovo* do probiótico à base de esporos do *Bacillus subtilis* não prejudicou a eclodibilidade e nem elevou o índice de mortalidade embrionária. A inoculação de

nutrientes, vacinas ou aditivos *in ovo*, requer a avaliação dos parâmetros do incubatório que são fundamentais no processo produtivo, pois tem alto impacto econômico em toda a cadeia avícola do frango de corte.

Andreatti Filho et al. (2006) não evidenciaram efeito da inoculação *in ovo* de *Lactobacillus salivarius* sobre a eclodibilidade dos ovos. Por outro lado, Campos et al. (2011) inocularam soluções nutritivas à base de glicose, sacarose, vitaminas e sais minerais e perceberam que a inoculação das soluções *in ovo* diminuiu a eclodibilidade e aumentou o número de ovos bicados e não-nascidos. Tactacan et al. (2013) alertaram que doses excessivas do *Bacillus subtilis* podem elevar a mortalidade das aves.

Além dos problemas gerados pelo uso indiscriminado dos antibióticos como promotores de crescimento, a avicultura enfrenta a contaminação dos pintos que, em geral, acontece logo depois da eclosão. Essa contaminação é, em parte, devida a uma característica específica das aves que, diferentemente de outros animais, na eclosão não recebem inoculação natural de microrganismos benéficos que se instalam no intestino e possibilitam maior resistência aos potenciais desafios ambientais (FLINT e GARNER, 2009).

TABELA 3 - ECLODIBILIDADE E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA DE PINTOS INOCULADOS IN OVO COM PROBIÓTICO

	Eclodibilidade (%)	Mortas e eliminadas (%)
Controle	87,23	0,57
Probiótico <i>in ovo</i>	88,68	1,13
CV, %	3,46	80,61
Valor de P	0,3917	0,1534

FONTE: A Autora (2017).

A administração de probiótico em diferentes vias foi avaliada em frangos de corte submetidos ou não ao desafio sanitário e os resultados são apresentados na TABELA 4. A administração *in ovo* resultou em maior ($p < 0,05$) peso e ganho de peso na primeira semana de vida dos pintos apenas em comparação com a administração via *spray*. A aplicação do probiótico nos demais tratamentos não influenciou ($p > 0,05$) o desempenho das aves, independentemente, do desafio sanitário.

A via de administração dos probióticos determina melhor ou pior capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes na formulação do produto usado. Nesse sentido, a inoculação de bactérias probióticas ainda no incubatório, seja *in*

ovo ou via *spray* pode ser uma alternativa aos entraves acima relatados. Por essas vias, a microbiota da ave já está “colonizada” antes do alojamento, além de contribuir para o desenvolvimento da mucosa intestinal, o que reflete na resposta imunológica do frango (PESSÔA et al., 2012).

Nos primeiros dias de vida, os pintos são mais suscetíveis à colonização por patógenos devido à baixa microbiota simbiótica da mucosa do intestino (FOYE et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2014). A camada de muco do epitélio intestinal é a primeira barreira física contra infecções (NISBET et al., 1994; CAMPOS et al., 2010).

Aves desafiadas apresentaram pior ($p < 0,05$) conversão alimentar em relação às aves mantidas em camas novas. A avaliação no período de 7 a 21 dias mostrou maior ($p < 0,05$) peso vivo das aves que receberam probiótico *in ovo* e na ração em relação à aplicação por *spray*. Aves submetidas ao desafio sanitário apresentaram menor ($p < 0,05$) peso vivo e ganho de peso e pior ($p < 0,05$) conversão alimentar que aves mantidas em condições sanitárias adequadas.

Considerando o período experimental total, de 1 a 21 dias, a administração de probiótico por *spray* resultou em menor ($p < 0,05$) peso vivo, entretanto semelhante ao obtido pelas aves que consumiram ração isenta de probiótico. Aves mantidas sobre cama de alto desafio sanitário apresentaram menor ($p < 0,05$) peso vivo que as aves criadas sobre cama nova.

A inclusão contínua na dieta de microrganismos benéficos exógenos, probióticos, pode induzir a estabilização da função da barreira gastrointestinal (GAGGIA et al., 2010) e, desta forma, manter o melhor desempenho das aves. A forma esporulada da bactéria tem a capacidade de resistir ao baixo pH do estômago e atingir o intestino em grandes quantidades, onde germina, sendo então eliminada no conteúdo fecal. Uma vez no ambiente intestinal, os bacilos colonizam e se multiplicam, promovendo assim a exclusão competitiva e o efeito probiótico (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004).

O resultado favorável ao uso do probiótico na ração também pode ser devido ao fato de a ração usada nesse experimento ter sido apenas moída e não submetida aos processos de peletização, em que, pelo efeito da temperatura, poderia haver o risco de inativação do microrganismo que compõe o probiótico.

O menor ganho de peso de aves criadas sobre camas com deficitário manejo sanitário pode ser atribuído à maior demanda de nutrientes para manter a homeostase frente ao desafio microbiológico (CONTINI, 2016). Ao sofrer agressão,

a mucosa intestinal luta por sua reposição celular, o qual ocorre pelo consumo de nutrientes oriundos das reservas energéticas do organismo da ave e da ração ingerida (FERNANDES et al., 2017). McBride e Kelly (1990) estimaram que a manutenção do epitélio intestinal e estruturas anexas de suporte tem custo de 20% da energia bruta consumida pelo animal.

TABELA 4 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE DE 1 A 7 DIAS, 7 A 21 DIAS E 1 A 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

	Peso vivo, g	Ganho de peso, g	Consumo de ração, g	Conversão Alimentar
1 a 7 dias				
Dietas				
Controle negativo	178,77 ^{ab}	127,15 ^{ab}	154,75	1,217
Probiótico <i>in ovo</i>	183,62 ^a	133,64 ^a	165,98	1,211
Probiótico <i>spray</i>	178,15 ^b	127,09 ^b	154,88	1,197
Probiótico na ração	180,37 ^{ab}	131,20 ^{ab}	161,88	1,233
Desafio				
Sem desafio	179,22	128,99	162,86	1,245 ^a
Com desafio	181,23	130,78	156,13	1,186 ^b
CV, %	3,20	4,37	9,30	6,39
Dietas	0,0444	0,0045	0,1093	0,7067
Desafio	0,1689	0,2673	0,0805	0,0056
Dietas x Desafio	0,7949	0,1119	0,2020	0,3962
7 a 21 dias				
Dietas				
Controle negativo	740,00 ^{ab}	565,96	837,73	1,512
Probiótico <i>in ovo</i>	752,58 ^a	578,28	869,01	1,525
Probiótico <i>spray</i>	717,32 ^b	553,61	841,45	1,540
Probiótico na ração	755,52 ^a	579,57	845,99	1,462
Desafio				
Sem desafio	758,28 ^a	580,56 ^a	853,70	1,480 ^b
Com desafio	723,39 ^b	557,16 ^b	843,88	1,543 ^a
CV, %	5,53	6,10	7,83	5,87
Dietas	0,0446	0,1226	0,5399	0,0796
Desafio	0,0019	0,0148	0,5989	0,0094
Dietas x Desafio	0,2003	0,4737	0,0534	0,5851
1 a 21 dias				
Dietas				
Controle negativo	740,00 ^{ab}	699,48	1020,86	1,459
Probiótico <i>in ovo</i>	752,58 ^a	711,92	1034,98	1,472
Probiótico <i>spray</i>	717,32 ^b	682,11	1000,67	1,482
Probiótico na ração	755,52 ^a	710,77	1007,87	1,433
Desafio				
Sem desafio	758,28 ^a	709,55	1024,26	1,451
Com desafio	723,39 ^b	692,22	1007,51	1,474
CV, %	5,53	5,29	6,73	5,01
Dietas	0,0019	0,0973	0,3686	0,2109
Desafio	0,0446	0,0940	0,5016	0,2719
Dietas x Desafio	0,2003	0,2053	0,0297	0,7219

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$) e pelo teste *F* ($p < 0,05$)
 FONTE: A Autora (2017).

Houve interação entre as dietas e o desafio sanitário sobre o consumo de ração (1 a 21 dias). No desdobramento da interação, foi observada diferença no consumo de ração, apenas para a administração de probiótico *in ovo* quando as aves foram ou não submetidas ao desafio sanitário (TABELA 5). Aves que receberam o probiótico *in ovo* e não foram desafiadas apresentaram maior ($p < 0,05$) consumo de ração em relação às aves desafiadas.

TABELA 5 - DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE AS DIETAS E DESAFIO SANITÁRIO SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO PARA FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

Desafio	Dietas				Valor de P
	Controle	Probiótico <i>in ovo</i>	Probiótico <i>spray</i>	Probiótico ração	
Sem desafio	1001,47	1082,45 ^A	1017,56	995,56	0,1162
Com desafio	1043,02	987,52 ^B	983,77	1020,17	0,1800
Valor de P	0,2707	0,0237	0,3372	0,4275	

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste F ($p < 0,05$).

FONTE: A Autora (2017).

O melhor desempenho entre os frangos oriundos de ovos inoculados com o probiótico (TABELA 5) pode ser melhor compreendido a partir das observações de Ferket e Uni (2006). Esses autores avaliaram a inoculação *in ovo* de carboidratos e observaram aos 10 dias de idade aumento no peso vivo dessas aves. Para os pesquisadores, o aumento decorre do melhor desenvolvimento intestinal e da melhor expressão enzimática que as aves mostraram no nascimento.

Resultados promissores já foram relatados por Corrêa et al. (2003) que, em experimentos sem e com desafio sanitário associados ao uso de probiótico às dietas no período de 1 a 21 dias de idade observaram resultados positivos indicando que podem substituir os APC nas rações de frangos de corte.

Uni et al. (2005) também detectaram aumento no peso vivo das aves no décimo dia de vida quando aplicaram *in ovo* uma solução contendo maltose, sacarose e dextrina. Os pesquisadores atribuíram esse resultado ao aumento da reserva de glicogênio hepático obtido pela inoculação dos nutrientes.

Na comparação com a literatura disponível sobre o uso do probiótico com esporos do *Bacillus subtilis* (10^9 UFC/g), os resultados encontrados no presente experimento se assemelham aos revelados por Murshed e Abudabos (2015). Esses pesquisadores observaram melhor desempenho para os frangos que receberam

probiótico via ração em comparação com a suplementação nutricional a base de prebióticos e antibióticos.

Aliakbarpour et al. (2012) suplementaram a dieta dos frangos de corte com probiótico à base de *Bacillus subtilis* e observaram melhor desempenho produtivo em comparação com uma dieta sem aditivos.

A avaliação da morfometria da mucosa do duodeno (TABELA 6) mostrou interação significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes formas de administração do probiótico e o desafio sanitário para o comprimento do vilo, largura da cripta, relação vilo:cripta e área de absorção. Entretanto, houve efeito independente do desafio sanitário para a largura e para a profundidade das criptas. Aves desafiadas aumentaram ($p < 0,05$) a largura e profundidade das criptas em relação às aves criadas em condições sanitárias adequadas (TABELA 6).

TABELA 6 - MORFOMETRIA DA MUCOSA DO DUODENO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

	Vilo		Cripta		RV:C	Área, μm^2	NC:V	Musc., μm
	Compr., μm	Larg., μm	Prof., μm	Larg., μm				
	Duodeno							
Dietas								
Controle negativo	786,97	77,44	68,77	26,16	12,58	22,49	3,03	110,27
Probiótico <i>in ovo</i>	693,95	78,27	67,91	25,68	11,00	19,56	2,99	98,62
Probiótico <i>spray</i>	760,81	79,27	66,69	26,07	12,38	21,99	2,54	105,49
Probiótico ração	798,12	82,74	66,04	26,52	12,46	21,34	2,88	110,05
Desafio								
Sem desafio	788,92	75,97 ^b	57,16 ^b	26,16	14,15	23,19	2,82	105,40
Com desafio	732,20	83,27 ^a	77,54 ^a	26,07	10,02	19,49	2,90	106,82
CV, %	11,64	15,10	23,88	14,57	20,59	19,52	22,77	17,96
Desafio	0,0100	0,0501	0,0001	0,9968	0,0001	0,0007	0,5620	0,7671
Dietas	0,0065	0,7610	0,9641	0,9299	0,2097	0,2067	0,1339	0,2796
Dieta x Desafio	0,0130	0,2978	0,3768	0,0109	0,0135	0,0012	0,7108	0,2711

Comp. Comprimento, larg.: largura, prof.: profundidade, RV:C: relação vilo:cripta, área: área de absorção, NV:C, número de cripta por vilo, Musc: espessura da camada muscular.

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$) e pelo teste *F* ($p < 0,05$)
 FONTE: A Autora (2017).

No desdobramento da interação para comprimento do vilo, observou-se que as aves que receberam dietas isentas de probiótico e quando submetidas ao desafio sanitário mostraram menor ($p < 0,05$) comprimento de vilo. Entretanto, o mesmo comportamento foi observado para as aves que receberam a inoculação do probiótico *in ovo*. Na avaliação dentro do grupo mantido em condições sanitárias

adequadas, não houve efeito ($p>0,05$) para nenhuma forma de aplicação de probiótico ou para o grupo que não recebeu o probiótico. Por outro lado, em situações de desafio sanitário, a aplicação de probiótico em *spray* ou adicionado à ração resultou em maior ($p<0,05$) comprimento do vilos (TABELA 7).

Quando ocorre aumento na taxa de mitose com aumento da taxa de extrusão, há aumento no número de células na tentativa de regeneração, podendo ser observado aumento na altura dos vilos (MAIORKA et al., 2003). Nesse estudo, porém, houve diminuição de aporte de nutrientes para o crescimento, conforme observado na avaliação do desempenho produtivo das aves submetidas a esse tratamento (TABELA 4).

Para a largura da cripta, o consumo da dieta controle pelas aves desafiadas resultou em maior ($p<0,05$) largura da cripta, já quando o probiótico foi administrado *in ovo*, observou-se efeito oposto, ou seja, menor ($p<0,05$) largura da cripta quando as aves foram submetidas ao desafio sanitário (TABELA 7).

Segundo Ohland e Macnaughton (2010), em casos de desafio entérico, há uma maior renovação celular da mucosa intestinal, o que leva a maior profundidade de cripta, em virtude da hiperplasia, resultante da atividade mitótica.

Porém, quando ocorre aumento na taxa de mitose com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, há um aumento no número de células e, conseqüentemente, um aumento na altura dos vilos (MAIORKA et al., 2003).

A aplicação de probiótico *in ovo* ou via *spray* assim como o fornecimento de uma dieta isenta de probiótico resultaram em menor ($p<0,05$) relação vilos:cripta. Para o fornecimento do probiótico na ração não houve diferença significativa ($p>0,05$) do desafio sanitário sobre a relação vilos:cripta (TABELA 7).

A área de absorção da mucosa do duodeno foi reduzida ($p<0,05$) pelo desafio sanitário para todas as dietas, com exceção da dieta suplementada com probiótico, em que não houve alteração ($p>0,05$) na área de absorção quando as aves foram submetidas ao desafio sanitário. Para as aves mantidas em condições sanitárias adequadas, a maior ($p<0,05$) área de absorção observada concentrou-se entre as aves que receberam dieta isenta de probiótico em comparação a aplicação *in ovo* ou na ração (TABELA 7).

TABELA 7 - DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE AS DIETAS E DESAFIO SANITÁRIO SOBRE A MORFOMETRIA DO DUODENO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

Comprimento de vilo, μm					Valor de P
Desafio	Dietas				
	Controle	Probiótico <i>in ovo</i>	Probiótico <i>spray</i>	Probiótico ração	
Sem desafio	853,90 ^a	742,78 ^a	793,80	765,20	0,1466
Com desafio	720,03 ^{Bb}	638,14 ^{Bb}	727,82 ^{AB}	831,04 ^A	0,0007
Valor de P	0,0294	0,0074	0,0959	0,1967	
Largura da Cripta, μm					Valor de P
Desafio	Dietas				
	Controle	Probiótico <i>in ovo</i>	Probiótico <i>spray</i>	Probiótico ração	
Sem desafio	23,81 ^b	27,92 ^b	26,15	26,75	0,1386
Com desafio	28,91 ^a	23,45 ^a	25,99	26,30	0,1134
Valor de P	0,0100	0,0474	0,8774	0,8611	
Relação Vilo:Cripta					Valor de P
Desafio	Dietas				
	Controle	Probiótico <i>in ovo</i>	Probiótico <i>spray</i>	Probiótico ração	
Sem desafio	16,20 ^a	12,64 ^a	14,67 ^a	13,11	0,0470
Com desafio	8,96 ^b	9,12 ^b	10,10 ^b	11,80	0,0859
Valor de P	0,0001	0,0058	0,0073	0,2530	
Área de absorção, μm^2					Valor de P
Desafio	Dietas				
	Controle	Probiótico <i>in ovo</i>	Probiótico <i>spray</i>	Probiótico ração	
Sem desafio	27,43 ^{Aa}	21,41 ^{Ba}	23,92 ^{ABa}	20,01 ^B	0,0027
Com desafio	17,54 ^b	17,45 ^b	20,05 ^b	22,67	0,1012
Valor de P	0,0002	0,0107	0,0341	0,3852	

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na mesma coluna diferem pelo teste F ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na mesma coluna diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: A Autora (2017).

Para a avaliação da morfometria da mucosa do jejuno, não se observou interação entre as formas de administração do probiótico e o desafio sanitário (TABELA 8). Houve apenas efeito da forma de administração do probiótico para a relação vilo:cripta, sendo que o menor ($p < 0,05$) valor foi observado quando o probiótico foi aplicado via *spray* em comparação à inclusão na ração das aves.

Esse resultado confirma o que foi observado em relação ao melhor desempenho produtivo (TABELA 4) das aves que receberam o probiótico na ração em relação ao probiótico aplicado via *spray*. Em situação de desafios entéricos, é necessário ocorrer maturação das células epiteliais para manter as inúmeras atividades funcionais da mucosa intestinal. O surgimento de “enterócitos imaturos” com baixa capacidade absorptiva, bem como reduzida atividade das enzimas na bordadura em escova pode comprometer a absorção de nutrientes e, em consequência, o desempenho produtivo (OHLAND e MACNAUGHTON, 2010).

TABELA 8 - MORFOMETRIA DA MUCOSA DO JEJUNO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

	Vilo		Cripta		RV:C	Área, μm^2	NC:V	Musc., μm
	Compr., μm	Larg., μm	Prof., μm	Larg., μm				
Dietas								
Controle negativo	415,12	70,80	52,19	24,48	7,96 ^{ab}	13,15	2,43	107,88
Probiótico <i>in ovo</i>	416,13	76,91	52,58	27,70	8,20 ^{ab}	12,65	1,97 ^b	104,52
Probiótico <i>spray</i>	414,61	80,14	50,21	26,55	7,87 ^b	11,88	2,05 ^{ab}	113,68
Probiótico ração	466,67	85,08	49,63	27,06	9,44 ^a	12,79	2,02 ^{ab}	119,23
Desafio								
Sem desafio	420,81	75,02	51,05	26,74	8,51	12,65	2,15	112,65
Com desafio	435,60	81,48	51,82	26,65	8,23	12,58	2,07	110,40
CV, %	18,96	21,63	17,29	9,51	19,21	20,08	21,64	18,31
Dietas	0,2013	0,1226	0,6040	0,1004	0,0287	0,5506	0,0296	0,2208
Desafio	0,4683	0,1325	0,7466	0,8871	0,4859	0,8985	0,4410	0,7122
Dieta x Desafio	0,1694	0,9562	0,4978	0,8156	0,6939	0,6541	0,9068	0,3290

FONTE: A Autora (2017).

A morfometria da mucosa do íleo não foi alterada pela forma de administração do probiótico e nem pela dieta controle isenta de probiótico (TABELA 9). Com relação ao desafio sanitário observou-se menor ($p < 0,05$) relação vilo:cripta e um maior ($p < 0,05$) número de criptas para cada vilo. A menor capacidade proliferativa observada nessas aves pode ser resultado da resposta inflamatória induzida pela microbiota presente na cama mal manejada (SHANMUGASUNDARAM, LILBURN e SELVARA, 2012).

TABELA 9 - MORFOMETRIA DA MUCOSA DO ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

	Vilo		Cripta		RV:C	Área, μm^2	NC:V	Musc., μm
	Compr., μm	Larg., μm	Prof., μm	Larg., μm				
Dietas								
Controle negativo	331,37	85,24	57,06	30,24	5,87	9,18	1,72	145,12
Probiótico <i>in ovo</i>	299,02	89,61	51,36	29,24	5,59	8,11	1,66	145,01
Probiótico <i>spray</i>	287,82	88,34	49,15	29,82	5,86	7,93	1,59	148,86
Probiótico ração	298,94	84,47	53,38	30,68	5,64	7,69	1,70	150,44
Desafio								
Sem desafio	292,57	80,76 ^b	48,49 ^b	29,96	5,94 ^a	8,32	1,54 ^b	140,69
Com desafio	316,01	93,33 ^a	56,99 ^a	30,03	5,55 ^b	8,15	1,80 ^a	154,01
CV, %	19,68	25,31	18,27	13,10	11,44	25,02	23,85	24,31
Dietas	0,2050	0,8935	0,1325	0,7605	0,5681	0,2007	0,8014	0,9638
Desafio	0,1230	0,0322	0,0008	0,9405	0,0270	0,7331	0,0105	0,1425
Dietas x Desafio	0,9798	0,3267	0,5722	0,3771	0,1804	0,9478	0,5044	0,7340

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na mesma coluna diferem pelo teste F ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na mesma coluna diferem pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: A Autora (2017).

A condição inflamatória da mucosa do duodeno, jejuno e íleo foi avaliada pela presença de material mucoso, congestão e petéquias (TABELA 10). Para a mucosa do duodeno, a presença de material mucoso e de petéquias foi maior na mucosa do duodeno ($p < 0,05$) quando as aves não receberam probiótico e foram submetidas ao desafio sanitário. Para a mucosa do jejuno, também observou-se maior ($p < 0,05$) presença de material mucoso em situação de desafio sanitário e quando não foi suplementado probiótico às aves. Para o íleo não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

TABELA 10 – ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CONDIÇÃO INFLAMATÓRIA DA MUCOSA DO DUODENO, JEJUNO E ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

	Duodeno		
	Material Mucoso	Congestão	Petéquias
Controle negativo	0,125 ^B	0,250	0,125 ^B
Probiótico in ovo	0,000 ^B	1,875	0,000 ^B
Probiótico spray	0,000 ^B	0,250	0,000 ^B
Probiótico ração	0,000 ^B	1,000	0,000 ^B
Controle negativo + Desafio	1,125 ^B	0,375	4,500 ^A
Probiótico in ovo + Desafio	1,625 ^A	0,750	1,875 ^{AB}
Probiótico spray + Desafio	0,375 ^{AB}	2,000	0,000 ^B
Probiótico ração + Desafio	0,250 ^{AB}	0,875	0,125 ^B
CV, %	34,171	48,637	31,299
Valor de P	0,0195	0,0535	0,0037
	Jejuno		
Controle negativo	0,000	0,125	0,000 ^B
Probiótico in ovo	0,000	0,250	0,125 ^B
Probiótico spray	0,000	0,000	0,000 ^B
Probiótico ração	0,000	0,250	0,000 ^B
Controle negativo + Desafio	0,500	0,125	2,875 ^A
Probiótico in ovo + Desafio	1,625	0,750	0,875 ^{AB}
Probiótico spray + Desafio	0,125	0,125	0,000 ^B
Probiótico ração + Desafio	0,500	0,125	0,000 ^B
CV, %	26,694	37,212	27,397
Valor de P	0,4462	0,8296	0,0071
	Íleo		
Controle negativo	0,00	0,000	0,00
Probiótico in ovo	0,00	0,000	0,00
Probiótico spray	0,00	0,375	0,00
Probiótico ração	0,00	0,125	0,00
Controle negativo + Desafio	0,00	0,125	0,00
Probiótico in ovo + Desafio	0,00	0,000	0,00
Probiótico spray + Desafio	0,00	0,000	0,00
Probiótico ração + Desafio	0,00	0,000	0,00
CV, %	0,00	21,322	0,00
Valor de P	1,0000	0,6398	1,0000

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

FONTE: A Autora (2017).

Mediante as condições de controle sanitário com baixo desafio imunológico e baixa carga microbiana presente no momento em que os frangos de corte foram alojados e submetidos ao desafio sanitário no presente estudo, os resultados obtidos na análise macroscópica das condições inflamatórias do intestino delgado, nos segmentos duodeno, jejuno e íleo, indicam que o *Bacillus subtilis* pode ser usado em substituição aos antibióticos como promotores de melhoria no equilíbrio microbiano intestinal das aves.

Os probióticos conferem proteção aos vilos e à superfície absorptiva intestinal contra toxinas irritantes produzidas por microrganismos patogênicos (FURLAN, MACARI e LUQUETTI, 2004). A competição com patógenos na ocupação de sítios de aderência nas vilosidades impedem a ação deletéria na parede intestinal por meio da exclusão competitiva (MENTEN e LODDI, 2002). Uma vez aderidas à mucosa intestinal da ave, as fímbrias das bactérias probióticas produzem substâncias que favorecem a manutenção da mucosa intestinal e conferem aí um ambiente inóspito para outras espécies (LEE et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

A inoculação de probiótico *in ovo*, à base de *Bacillus subtilis*, não interferiu com a eclodibilidade e mortalidade embrionária. Todavia, a indução do desafio no alojamento experimental dos frangos de corte em cama velha revelou-se prejudicial para o desempenho produtivo independentemente da aplicação do probiótico e/ou dos tratamentos. As diferentes formas de aplicação de probiótico alteraram a morfometria do duodeno, principalmente, mostrando correlação com o desempenho produtivo das aves. A intensidade das lesões macroscópicas observadas na mucosa intestinal das aves submetidas ao desafio sanitário foi maior quando a dieta ofertada não continha probiótico com comparação com as aves não desafiadas e que receberam suplementação nutricional. Esses resultados evidenciam a contribuição do *Bacillus subtilis* na manutenção da saúde intestinal e apontam para a importância do manejo adequado da cama de alojamento tendo em vista o alcance de maior produtividade na avicultura de corte.

REFERÊNCIAS

ALIAKBARPOUR, H. R. et al. The Bacillus subtilis and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 25, n. 9, p. 1285-93, 2012.

ANDREATTI FILHO, R. L. et al. Effect of cecal microflora and Lactobacillus salivarius in ovo administration used on chicken previously challenged with Salmonella enterica serovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 467-71, 2006.

BRACARENSE, A. P. et. al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1776-86, 2012.

CAMPOS, A. M. A.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S. Nutrição in ovo de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 7, n. 4, p.1304-13, 2010.

CAMPOS, A. M. A. et al. Effect of in ovo inoculation of nutritious solutions on the hatchability and performance of broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1712-17, 2011.

CAWOY, H. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by Bacillus subtilis/amyloliquefaciens. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 281-95, 2015.

COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, n. 6, p. 274, 2011.

CONTINI, J. P. **Óleos funcionais em dietas de frangos de corte, matrizes e progênie**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Paraná. Palotina, PR: UFPR, 2016.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CORRÊA, G. S. S. et al. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 467-73, 2003.

CUKROWSKA, B. et al. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 2, p. 204-9, 2002.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n.2, p. 214-20, 2011.

DE OLIVEIRA, J. E. et al. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 818-29, 2014.

EC. Council of the European Union. Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feeding-stuffs. European Commission. **News**: ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect 2003. Disponível em: <http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm>. Acesso em> 20 mar. 2017.

FERKET, P., UNI, Z. Early feeding in-ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: **Anais**. Conference European Poultry 12th, Verona. Conference European Poultry, 2006 (CD-ROM).

FERNANDES, J. I. M. et al. Avaliação de extratos de plantas sobre a resposta imune, o desempenho produtivo e a morfometria intestinal de frangos de corte desafiados com *Eimeria* sp. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 18, n. 1, p. 127-39, 2017.

FERREIRA, F. A. B.; KUSSUKAWA, K. C. K. Uso de probiotico na alimentação de frango de corte. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p.40-43 2008.

FLINT, J. F.; GARNER, M. R. Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 2, p. 367-78, 2009.

FOYE, O. T.; UNI, Z.; FERKET, P.; Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-92, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141 Suppl 1, n. p. S15-28, 2010.

HONG, H. A. et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 813-35, 2005.

JIN, L. Z. et al. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 9, p. 397-404, 1996.

KISIELINSKI, K. et al. Simple method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical Expertise Medical**, v. 2, p.131-35, 2002.

KRUSKAL, W. H., WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p.583-621, 1952.

LEE, K. W. et al. Effect of *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials on immune status in broiler chickens raised on fresh or used litter. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1592-97, 2013.

LIMA, A. C. F.; PIZAURO JÚNIOR, J. M.; MACARI, M. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 200-7, 2003.

LIMA, E. T. et al. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 2, p. 103, 2007.

LINZMEIER, L. G. et al. Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, a. VII, n. 12, 2009.

MAIORKA, A. et al. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 4, p. 483-92, 2003.

McBRIDE, B. W.; KELLY, J. M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 9, p. 2997-3010, 1990.

MURSHED, M. A.; ABUDABOS, A. M. Effects of the dietary inclusion of a probiotic, a prebiotic or their combinations on the growth performance of broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. SPE, p. 99-103, 2015.

SILVA, E. N.; ANDREATTI, R. L. F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: **Anais. II Simpósio da Sanidade Avícola**, v. 1, p. 45-55, 2000.

NISBET, D. J. et al. Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 1, p. 12-5, 1994.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, p. G807-G19, 2010.

PESSÔA, G. B. S. et al. New concepts in poultry nutrition. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 755-74, 2012.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 3 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal, SP: Funep, 2007.

SWANN, M. M et al. **Report of the joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine**. London: Her Majesty's Stationer Office, 1969.

SANTOS, E. **Aditivos alternativos ao uso de antibiótico na alimentação de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2003.

SANTOS; J. R. G.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 741-47, 2005.

SAS. Institute Inc. **Software and services**: system for Windows, version 8.0 software Cary, US, 2002.

SHANMUGASUNDARAM, R.; LILBURN, M. S.; SELVARAJ, R. K. Effect of recycled litter on immune cells in the cecal tonsils of chickens. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 95–100, 2012.

TACTACAN, G. B. et al. A *Bacillus subtilis* (QST 713) spore-based probiotic for necrotic enteritis control in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 4, p. 825-31, 2013.

UNI, Z. et al. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v.84, n.5, p.764-70, 2005.

UNI, Z.; FERKET, P. R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**. v. 6, p. 101-11, 2004.

CAPÍTULO II – DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO SOBRE A DIVERSIDADE DA MICROBIOTA INTESTINAL E CECAL DE FRANGOS DE CORTE DE 1 A 21 DIAS DE IDADE SUBMETIDOS AO DESAFIO SANITÁRIO

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as diferentes formas de administração de probiótico à base do *Bacillus subtilis* sobre a diversidade da microbiota intestinal e cecal de frangos de corte de um a vinte e um dias (1-21d) de idade submetidos ao desafio sanitário. Foram alojados 640 pintos, machos, linhagem *Cobb*, em um delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 4 x 2 (4 formas de administração: dieta isenta de probiótico, controle negativo, probiótico *in ovo*, probiótico via *spray* pós-eclosão e probiótico na ração vs 2 condições sanitárias segundo a cama de aviário nova ou velha), obtendo-se oito dietas, oito repetições em dez aves por gaiola, totalizando 64 unidades experimentais. Houve maior prevalência do filo *Firmicutes* tanto no intestino delgado como no ceco, independentemente do desafio sanitário. Em relação à classificação filogenética gênero, no intestino delgado, houve uma maior prevalência dos gêneros pertencentes à ordem *Lactobacilales*. O gênero *Alistipes* e *Bacterioides* da ordem *Enterobacteriales* ocorreu com maior frequência no ceco das aves desafiadas em relação às não desafiadas. A utilização de probiótico contendo *Bacillus subtilis* de forma contínua na ração resultou no maior equilíbrio da microbiota intestinal e do ceco em relação às demais formas de aplicação. O desafio sanitário alterou a frequência das bactérias que compõem a microbiota do ceco de forma mais evidente que a do íleo. A diversidade e frequência das bactérias encontradas principalmente no ceco das aves são indicativas da estreita relação existente entre a microbiota intestinal dos frangos com a microbiota da cama de aviário.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, cama de aviário, classificação filogenética, *Lactobacillus*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the different forms of probiotic administration based on *Bacillus subtilis* on the intestinal and cecal microbiota diversity of broiler chickens from one to twenty one days (1-21d) of age submitted to the sanitary challenge. A total of 640 male, *Cobb* lineage chicks were housed in a completely randomized design, 4 x 2 factorial scheme (4 administration forms: probiotic-free diet, negative control, probiotic *in ovo*, post-hatch probiotic spray and probiotic in ration vs 2 sanitary conditions according to the bed of new or old aviary), obtaining eight diets, eight replicates in ten birds per cage, totaling 64 experimental units. There was a higher prevalence of filo *Firmicutes* in both the small intestine and the cecum, regardless of the health challenge. Regarding the genomic phylogenetic classification, in the small intestine, there was a higher prevalence of the genera belonging to the *Lactobacillus* order. The genus *Alistipes* and *Bacterioides* of the order *Enterobacteriales* occurred more frequently in the cecum of the challenged birds compared to the non-challenged ones. The use of probiotic containing *Bacillus*

subtilis continuously in the diet resulted in the greater balance of the intestinal microbiota and the cecum in relation to the other forms of application.

The health challenge altered the frequency of the bacteria that make up the microbiota of the cecum more clearly than that of the ileum. The diversity and frequency of bacteria found mainly in the cecum of the birds are indicative of the close relationship between the intestinal microbiota of the chickens and the microbiota of the aviary bed.

Key words: *Bacillus subtilis*, aviary bed, phylogenetic classification, *Lactobacillus*.

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal das aves é constituída por uma população heterogênea de bactérias, bastante complexa e dinâmica, constituída por inúmeras espécies que vivem em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. Na grande maioria, sua composição contém bactérias anaeróbias facultativas produtoras de ácido láctico e bactérias anaeróbias estritas (ZHU et al., 2002, PAN e YU, 2014).

A composição da microbiota bacteriana é afetada pelas bactérias presentes no intestino e pelos microrganismos naturais do ambiente (YIN et al., 2010; WANG et al., 2016). O embrião pode ser colonizado por via vertical durante a formação do ovo, por meio do contato com os microrganismos presentes no sistema reprodutor da mãe. Também pode ocorrer ao ingerir o conteúdo do fluido amniótico a partir do 14º dia de incubação (PEDROSO, 2011). A presença de patógenos e a consequente liberação de toxinas no saco vitelínico permite que os microrganismos sejam absorvidos pelo embrião junto com o conteúdo do saco da gema (DEEMING, 2005).

O perfil da microbiota pode ser também alterado por diversos fatores, tanto endógeno quanto exógenos. As más condições higiênicas e sanitárias da criação, estresse, alimentação inadequada, intoxicação e enfermidade concomitante, podem desencadear o aumento da proliferação bacteriana que podem competir por nutrientes da própria ave (ITO, MIYAJI e OKABAYASHI, 2007).

As bactérias produzem diversos metabólitos que podem ser bons ou prejudiciais ao hospedeiro, sendo capazes de interagir com o epitélio gastrointestinal podendo causar modificações estruturais e funcionais no mesmo, comprometendo a digestão lipídica e modificando a digestão de carboidratos e proteínas, e causando um aumento nas exigências nutricionais, ou mesmo, agir beneficentemente contra patógenos por meio de exclusão competitiva (RINTTILÄ e APAJALAHTI, 2013).

Muitas pesquisas mostram que é possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal por meio da introdução de probióticos pela alimentação (ZHANG et al, 2014). A inoculação de substâncias permite, portanto, a introdução de nutrientes específicos em contato com a mucosa intestinal antes da eclosão, direcionando a diferenciação celular e melhorando a capacidade de digerir alimentos pelo pintainho.

As espécies de *Bacillus* spp, ao contrário das bactérias ácido lácticas, não são normalmente encontradas no trato gastrointestinal (SUN, WANG e ZHANG, 2010), por não serem comumente organismos colonizadores que se aderem aos sítios de ligação dos enterócitos (SEN et al., 2012). Dessa forma, esporos de *Bacillus* spp. são amplamente difundidos como probióticos e agentes de exclusão competitiva em humanos e animais, o que os diferencia das demais espécies de microrganismos utilizados que estão em sua forma vegetativa. A forma esporulada da bactéria tem a capacidade de resistir ao baixo pH do estômago e atingir o intestino em grandes quantidades, onde germinam, sendo então eliminados no conteúdo fecal. O *Bacillus subtilis*, cepa comumente utilizada na composição de probióticos, transita pelo intestino juntamente com o conteúdo intestinal e sua prevalência dificulta a fixação dos microrganismos patogênicos, mediante a exclusão competitiva ou antagonismo direto (PAN e YU, 2014).

Nessas considerações, o objetivo desse estudo foi avaliar diferentes formas de administração de probiótico sobre a diversidade da microbiota intestinal e cecal de frangos de corte no período de um a vinte e um (1-21d) dias de idade submetidos ao desafio sanitário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no biotério de aves da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina e no incubatório de uma Agroindústria da região Oeste do Paraná. Todos os procedimentos com uso de animais neste trabalho foram submetidos à avaliação e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR - Setor Palotina (Protocolo 39/2016)

Foram utilizados 640 pintos machos de um dia de idade, da linhagem *Cobb* 500, provenientes de matrizes de 37 semanas de idade. As aves foram distribuídas

em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (controle + 3 formas de administração do probiótico vs com e sem desafio), obtendo-se oito tratamentos com oito repetições e dez aves por unidade experimental. As dietas experimentais estão discriminadas na TABELA 1.

TABELA 1 - DIETAS EXPERIMENTAIS

Grupo	Identificação do Tratamento	Especificação do Tratamento
Não Desafiado	Dieta 1	Dieta isenta de probiótico (controle negativo)
	Dieta 2	Probiótico <i>in ovo</i>
	Dieta 3	Probiótico via spray pós-eclosão
	Dieta 4	Probiótico na ração
Desafiado	Dieta 5	Dieta isenta de probiótico
	Dieta 6	Probiótico <i>in ovo</i>
	Dieta 7	Probiótico via spray pós-eclosão
	Dieta 8	Probiótico na ração

FONTE: A Autora (2017).

No incubatório da Agroindústria, no 18º dia de incubação, um carrinho de incubação contendo 15 andares (168 ovos/andar) foi levado para a máquina de vacinação *in ovo* e em cada ovo foi injetado 0,5mL de solução (0,05g probiótico + diluente). Uma amostra dessa solução foi coletada para realização da análise de quantificação de *Bacillus spp.* inoculado *in ovo*, onde foi encontrado 10^7 UFC/g de *Bacillus subtilis*.

Os ovos devidamente identificados foram transferidos para as bandejas do nascedouro e permaneceram ali juntamente com os demais ovos até a eclosão. Após a eclosão desses ovos inoculados, os pintos foram sexados e classificados, sendo selecionados 160 pintos machos. Dos demais ovos eclodidos e não inoculados foram selecionados e sexados mais 160 pintos, os quais submetidos à aspersão de 0,05g probiótico + diluente por meio do equipamento utilizado para vacinas contra doenças respiratórias. Outros 320 pintos, depois de sexados, junto com os demais foram transferidos para o biotério de aves da UFPR – Setor Palotina.

A dieta basal (TABELA 2) foi elaborada à base de milho, farelo de soja e farinha de carne, formulada conforme valores de composição química dos alimentos e de maneira a atender os requerimentos nutricionais das aves e as recomendações nutricionais adotadas pelas integrações avícolas da região (ROSTAGNO et al., 2011). As aves do grupo controle (isento de probiótico) e as que receberam o probiótico *in ovo* ou via *spray* foram alimentadas durante todo o período experimental com a dieta basal (isenta de antibióticos promotores de crescimento ou

de probióticos). A dieta basal, suplementada com probiótico (150g/t.), foi ofertada às aves dos tratamentos (dietas 4 e 8, TABELA 1).

O desafio experimental foi induzido por meio da utilização de cama velha, descartada de um aviário comercial e associada à ocorrência de enterites inespecíficas. Nas demais gaiolas utilizou-se maravalha nova. O manejo das aves se iniciava pelas aves do grupo controle e, em seguida, eram manejadas as aves desafiadas a fim de evitar a contaminação entre os grupos.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA DIETA EXPERIMENTAL DOS FRANGOS

Ingredientes (%)	Período de 1-21 dias de vida
Milho	53,07
Farelo de soja	34,00
Farinha de carne	5,20
Óleo de soja	4,10
Farinha de vísceras	1,50
Calcário	0,340
Sal comum	0,310
Bicarbonato de sódio	0,103
Colina 60%	0,086
L-Lisina 70%	0,316
L-Treonina 98%	0,092
L-Valina	0,021
Composição nutricional	Valores calculados (100%)
Energia metabolizável (kcal/kg)	3050
Proteína bruta (%)	21,90
Cálcio (Ca %)	0,908
Fósforo disponível (P%)	0,454
Arginina digestível (%)	1,415
Glicina + Serina total (%)	2000
Isoleucina digestível	0,873
Lisina digestível (%)	1170
Mitionina digestível	0,556
Met + Cist. digestível	0,850
Treonina digestível	0,770
Triptofano digestível	0,246
Valina digestível	0,925

¹ Nível por kg de premix inicial: Vitamina A (KUI/KG 4,000,00); Vitamina D3(KUI/KG 1,167,,000); Vitamina E (UI/KG 10,000,00) Vitamina K3 (mg/kg 1,000,00); Vitamina B1-Tiamina (mg/kg 1,000,00); Vitamina B2 – Riboflavina (mg/kg 2,666,666); Vitamina B6 – Piridoxina (mg/kg 1,667,00); Vitamina B12 – Cianocobalamina (mg/kg 6,666,00); Acido Pantatênico (mg/kg 6, 000,00) Niacina (mg/kg 13,000,00); Ácido Fólico (mg/kg 833,33); Biotina (mcg/kg 80,000,00); Manganês (ppm 40,000,00); Zinco (ppm 33,333,33); Ferro (ppm 23,333,00); Cobre (ppm 2,666,67); Iodo (ppm 333,33); Selênio (ppm 80,00); Etoxiquin (mg/Kg 22,200,00); Fitase Phyzyme (g/kg 16,667); AXTRA XAP 101 TPT (g/kg 33,333,00).

FONTE: A Autora (2017).

O ambiente de criação das aves consistia em uma sala climatizada (ar condicionado e exaustores) com oito baterias de gaiolas, cada uma composta por oito gaiolas (0,55 x 0,80m), totalizando 64 unidades experimentais. A temperatura de conforto térmico das aves foi regulada de acordo com a idade. Água e ração foram

fornechas *ad libitum* durante todo o período do ensaio (1-20d). Aos 21 dias foram sacrificadas 16 aves/tratamento para coleta do conteúdo intestinal do íleo e ceco. O conteúdo de cada segmento foi obtido imediatamente depois do sacrifício, utilizando-se material esterilizado para cada segmento a fim de evitar a contaminação entre segmentos. Após a identificação, foram compostas alíquotas de 4 amostras/trat. (*pool* de 4 aves) para cada segmento, resultando em 64 amostras (32 amostras do íleo e 32 amostras do ceco). As amostras foram armazenadas em ultra freezer à -80°C até o momento da extração do 16S rDNA bacteriano. A microbiota intestinal foi analisada pela extração do material do DNA das amostras do conteúdo intestinal, seguido por amplificação e sequenciamento pela técnica de PCR.

A partir de 1ng de DNA, realizou-se a amplificação com os primers específicos da região V3-V4 do rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (TABELA 3), na concentração de 0,2µM. O preparo das bibliotecas de sequenciamento ocorreu de acordo com tecnologia proprietária da Neoprosecta Microbiome Technologies e o sequenciamento realizado pela plataforma MiSeq (Illumina).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS PRIMERS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Primer	Sequência	Referência
341F	CCTACGGGRSGCAGCAG	Wang e Qian (2009)
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	Caporaso et al. (2012)

FONTE: A Autora (2017).

Após o sequenciamento foi realizada uma análise de bioinformática básica para classificação taxonômica dos *reads* de acordo com o banco de dados próprio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas FIGURAS 1, 3, 5, 7, 9 e 11 apresentam-se as frequências de filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies de bactérias encontradas na microbiota do íleo, enquanto que para o ceco as respectivas frequências são mostradas nas FIGURAS 2, 4, 6, 8, 10 e 12.

No intestino delgado, dentre os filos encontrados, os mais frequentes foram *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (FIGURA 1). No ceco prevaleceram os

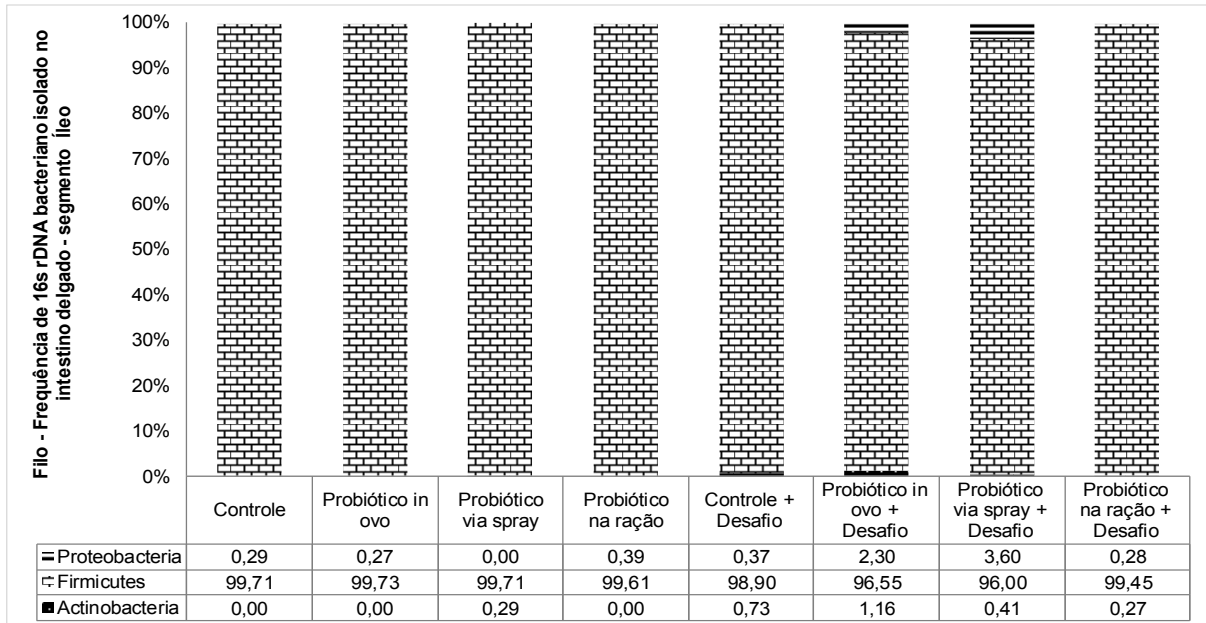
filos *Bacteroides*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* (FIGURA 2). O filo *Firmicutes* ocorreu em maior frequência no intestino delgado ($96,00 \leq 99,73\%$) e no ceco ($46,98 \leq 98,06\%$).

Em relação ao desafio sanitário, é interessante observar (Figuras 1 e 2), que as aves submetidas ao desafio reduziram pela metade a frequência do filo *Firmicutes* no ceco, enquanto isso não ocorreu no intestino. Outra observação é que o tratamento composto por probiótico na ração, antes do desafio apresentava a maior população de *Firmicutes* no ceco (98,06%), entretanto, após o desafio a frequência caiu para 46,98%. Nesse mesmo tratamento observou-se a elevação das bactérias do filo *Bacteroidetes* de 1,23% para 53,02%. Idêntico comportamento, entretanto, menos evidente, foi observado para os demais tratamentos quando as aves foram submetidas ao desafio sanitário.

A prevalência do filo *Firmicutes* entre os frangos dos grupos sem e com desafio mostra-se concordante com os resultados encontrados por Wang, Lilburn e Yu (2016). Em relação ao grupo desafiado, submetido ao baixo potencial sanitário da cama de alojamento, os pesquisadores encontraram a maior prevalência do filo *Firmicutes* tanto no intestino delgado e ceco quanto na análise da cama do aviário. Conforme esses pesquisadores, o percentual encontrado é indicativo de estreita relação existente entre a prevalência dos membros desse filo na microbiota intestinal dos frangos com a microbiota existente na cama. Nessa relação há reais possibilidades de efeitos mútuos, ou seja, de a microbiota da cama influenciar na composição da microbiota gastrointestinal das aves e vice-versa.

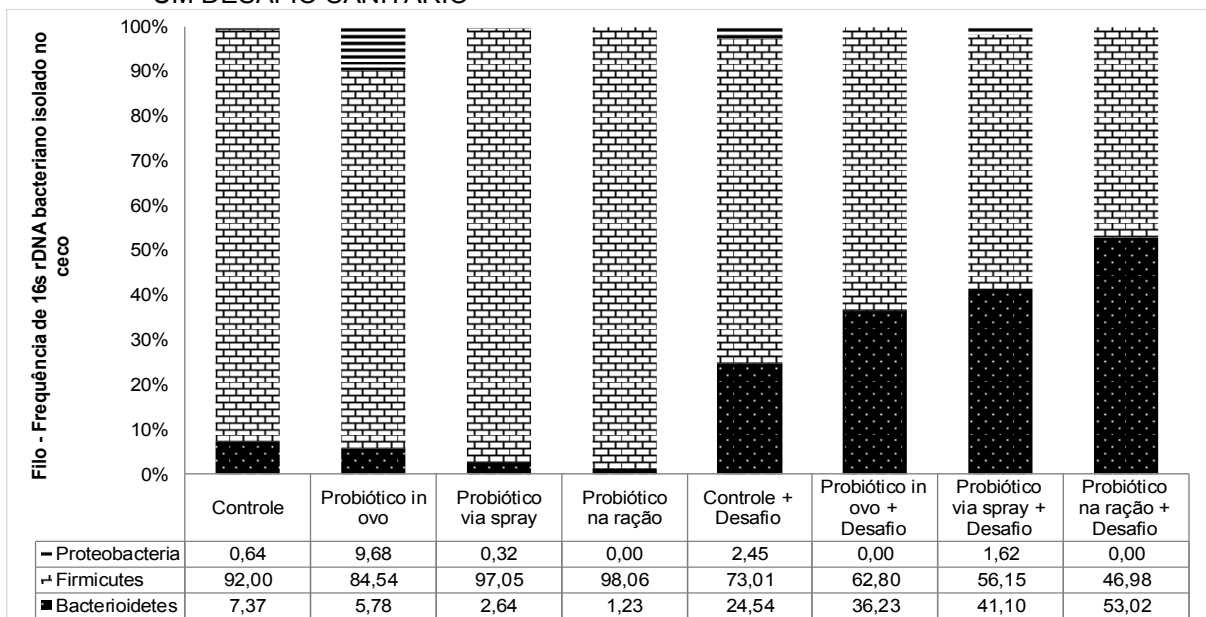
Entre as classes bacterianas, no intestino delgado, íleo, prevaleceu a classe *Bacilli* seguida das classes *Clostridia*, que pertencem ao filo *Firmicutes* e das classes *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*) e *Actinomicetos* (filo *Actinobacteria*) (FIGURA 3). No ceco (FIGURA 4) houve maior diversidade de classes de bactérias com variados índices percentuais de *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*), *Clostridia* e *Erysipelotrichia* (filo *Firmicutes*) e *Bacteroidia* (filo *Bacteroides*). Entre as classes identificadas, dietas e independentemente do desafio, observou-se menor prevalência da classe *Bacilli* no intestino das aves que receberam dieta isenta de probiótico (Figura 3). No ceco, o desafio sanitário diminuiu a ocorrência das classes *Clostridia* e *Bacilli* e aumentou a frequência da *Bacteroidia* (FIGURA 4).

FIGURA 1 - FILO-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO.



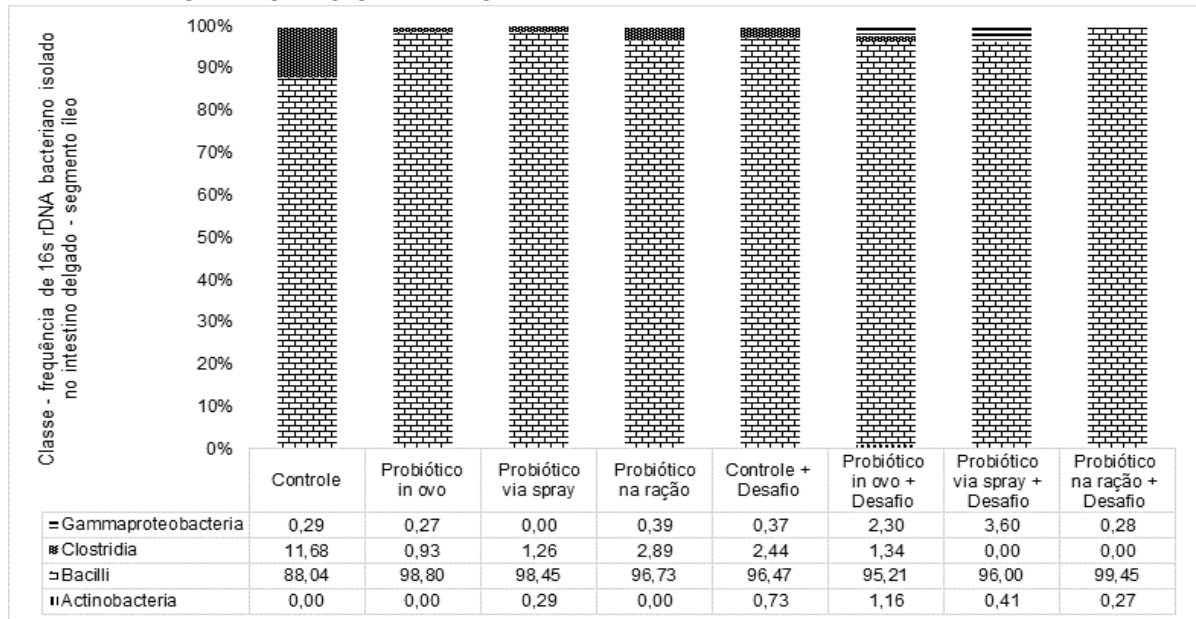
FONTE: A Autora (2017).

FIGURA 2 - FILO-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO



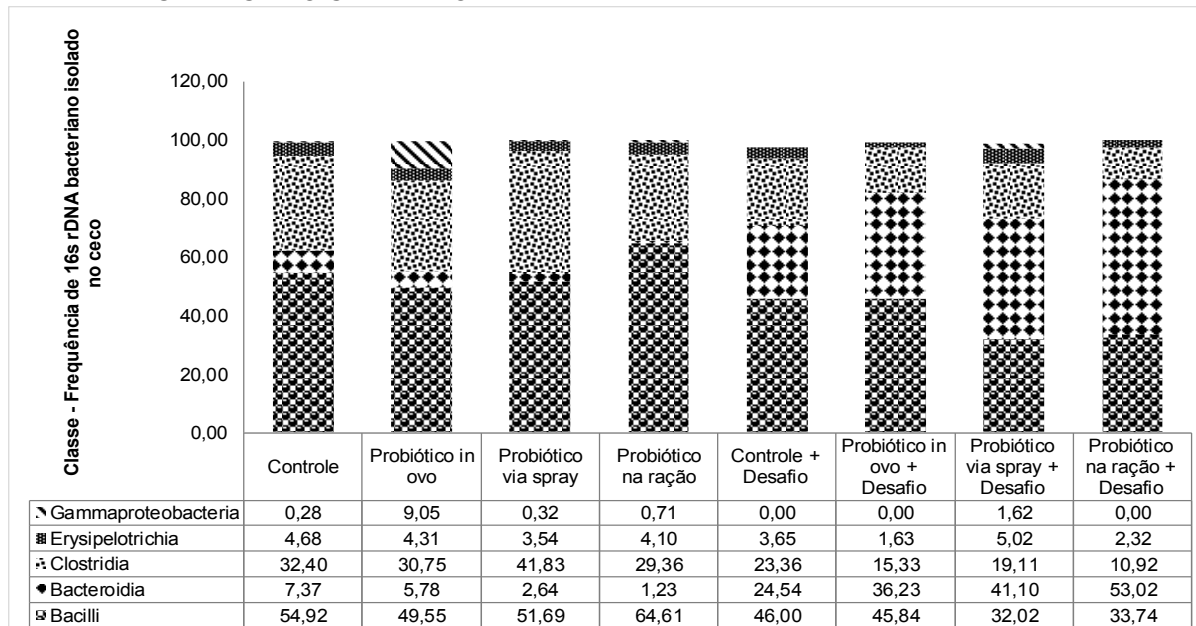
FONTE: A Autora (2017).

FIGURA 3 - CLASSE-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S rDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO



FONTE: A Autora (2017).

FIGURA 4 - CLASSE-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S rDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

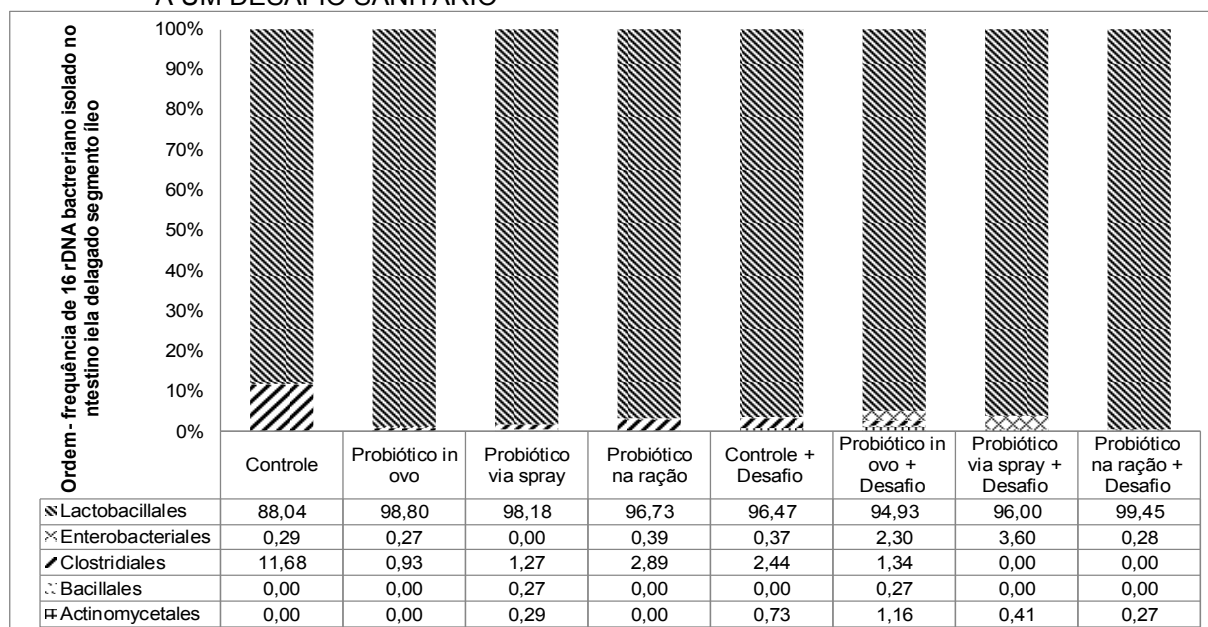


FONTE: A Autora (2017).

Dentro da classe *Clostridia*, a ordem *Clostridiales* foi a única identificada no íleo a com maior frequência registrada para a dieta isenta de probiótico. Da classe *Bacilli* forma identificadas as ordens *Lactobacilates*, que se revelou menor para o tratamento controle, e *Bacilates*. Além dessas, observou-se presença das ordens *Enterobacteriales* (Classe *Gammaproteobacteria*) e *Actinomycetales* (Classe *Actinobacteria*) (FIGURA 5).

Na classe *Gammaproteobacteria* se encontram bactérias pertencentes à ordem *Enterobacteriales* que, conforme Hernández-Arranz (2015), desempenham papel importante associado ao funcionamento do intestino animal na fixação de nitrogênio, desintoxicação e defesa contra patógenos. Por outro lado, dentro desse filo, classe e ordem há presença de variantes de *Escherichia coli* comensais da microbiota intestinal, mas que podem produzir moléculas para favorecer a adesão às células da mucosa, mas, também, acabam favorecendo a adesão da *Escherichia coli* enteropatogênica (MACARI et al., 2014).

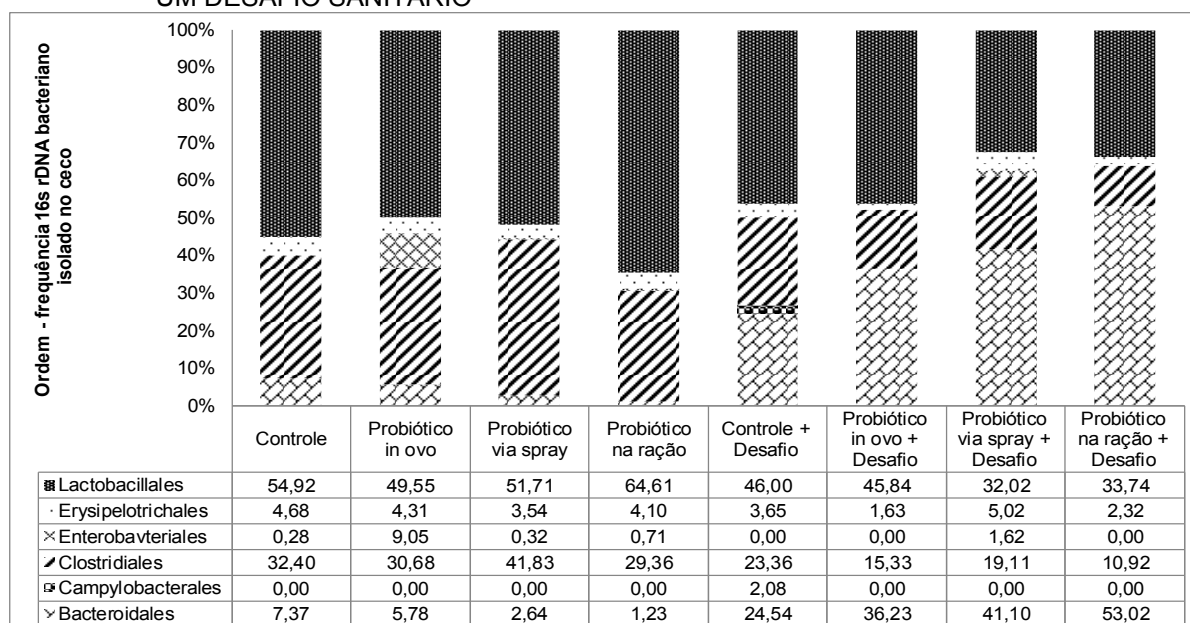
FIGURA 5 - ORDEM-FREQUÊNCIA (%) DE 16S rDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO



FONTE: A Autora (2017).

No ceco (FIGURA 6), como já relatado para as classes identificadas, as ordens *Lactobacillates*, da classe *Bacilli* e *Clostridiales*, da classe *Clostridia*, diminuiram a frequência quando as aves forma submetidas ao desafio sanitário.

FIGURA 6 - ORDEM-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S rDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

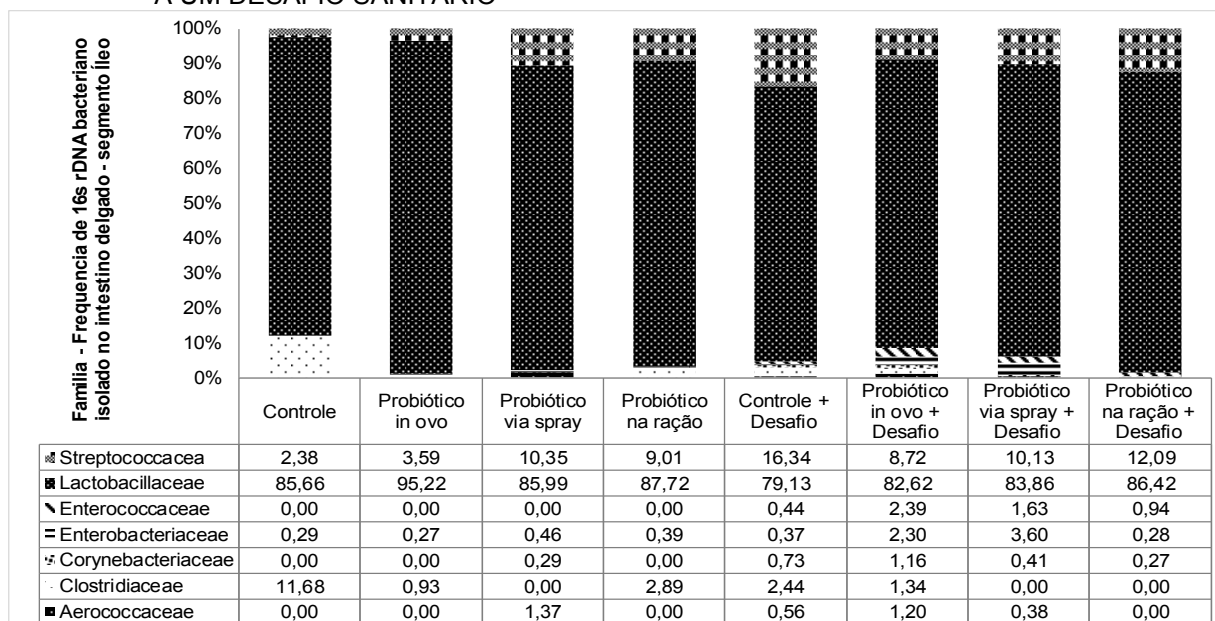


FONTE: A Autora (2017).

As famílias identificadas no intestino delgado foram: Streptococcaceae, Lactobacillaceae, Enterococaceae e Aerococcaceae, da ordem Lactobacilates, a Clostridiaceae da ordem Clostridiales, a Corynebacteriaceae da ordem Actinobacteria e a família Enterobacteriaceae da ordem Enterobacteriales. Para o tratamento dieta controle, destaca-se menor frequência da família Lactobacillaceae e maior frequência para a Clostridiales (FIGURA 7)

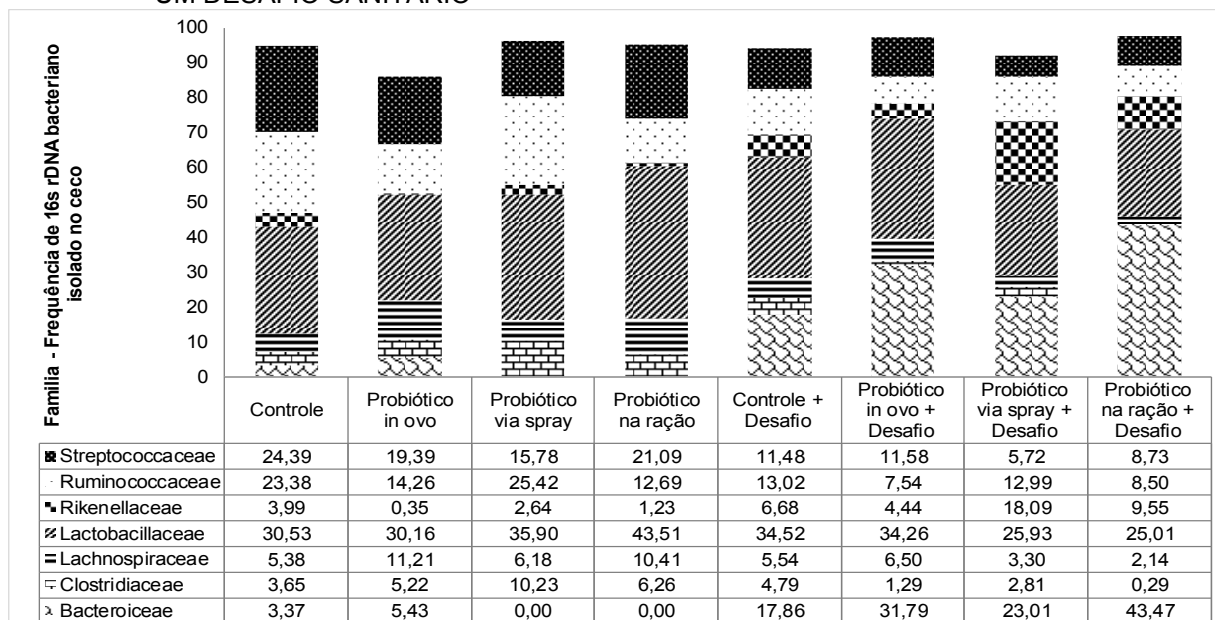
No ceco, as famílias identificadas foram: *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae* da ordem *Lactobacilates*, já para a ordem *Clostridiales*, houve uma maior diversidade de famílias identificadas: *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* em comparação ao intestino. Também identificaram-se as famílias *Rikenellaceae* e *Bacteriaceae* da ordem *Enterobacteriales*. Quando submetidas ao desafio, as aves apresentaram menor ocorrência das famílias *Streptococcaceae* e *Ruminococcaceae* e aumento da frequência para a *Rikenellaceae*, principalmente para as dietas acrescidas de probiótico (FIGURA 8).

FIGURA 7 - FAMÍLIA-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO



FONTE: A Autora (2017).

FIGURA 8 - FAMÍLIA-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

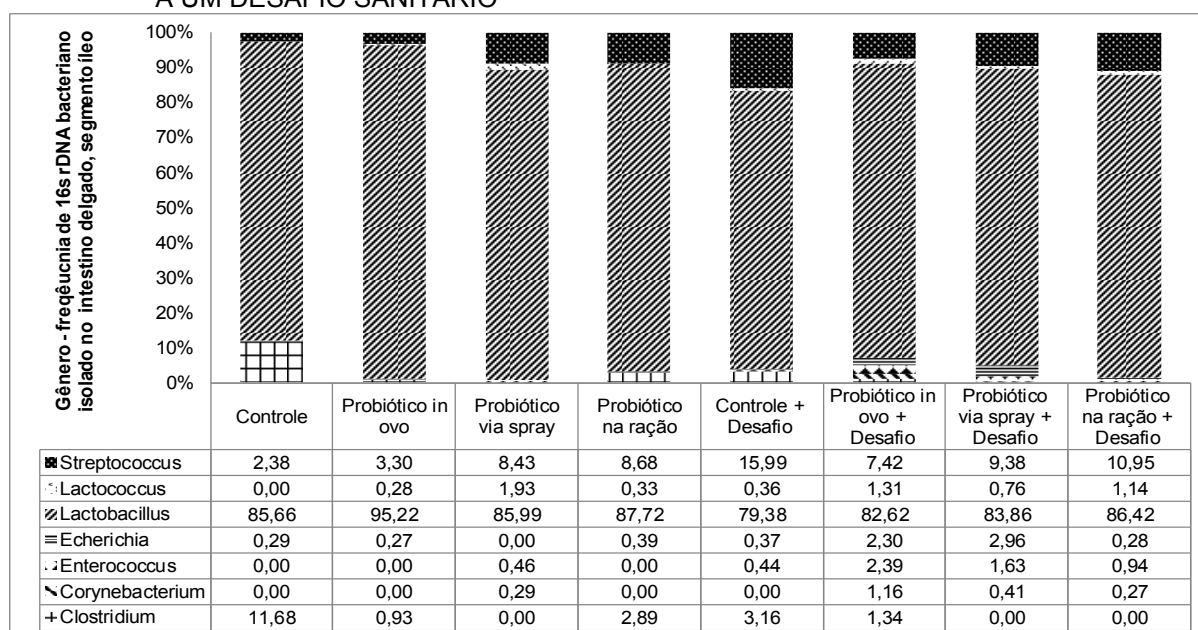


FONTE: A Autora (2017).

Em relação à classificação filogenética gênero, no intestino delgado (FIGURA 9), houve maior prevalência dos gêneros pertencentes à ordem *Lactobacilales*, cuja identificação das famílias aparece na FIGURA 7. O gênero *Streptococcus* foi mais frequente entre as aves desafiadas do que naquelas mantidas sob condições sanitárias adequadas, especialmente em relação ao tratamento controle, ou seja, isento de probiótico. Destaca-se também maior ocorrência do gênero *Clostridium* no tratamento controle e aumento do gênero *Escherichia* nas aves que receberam o probiótico em dose única no incubatório, administração *in ovo*, e desafiadas durante os 21 dias de vida.

O gênero *Clostridium* é um grupo bastante heterogêneo composto por bactérias Gram-positivas anaeróbicas, formadoras de esporos (PAREDES et al., 2005). A espécie *Clostridium perfringens* é o patógeno mais importante deste gênero para aves por ser responsável pela enterite necrótica, resultando em prejuízos econômicos à avicultura industrial (TIMBERMONT et al., 2011). Entretanto, no presente estudo não foi detectada espécies de *Clostridium* presente no tratamento controle.

FIGURA 9 - GÊNERO-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

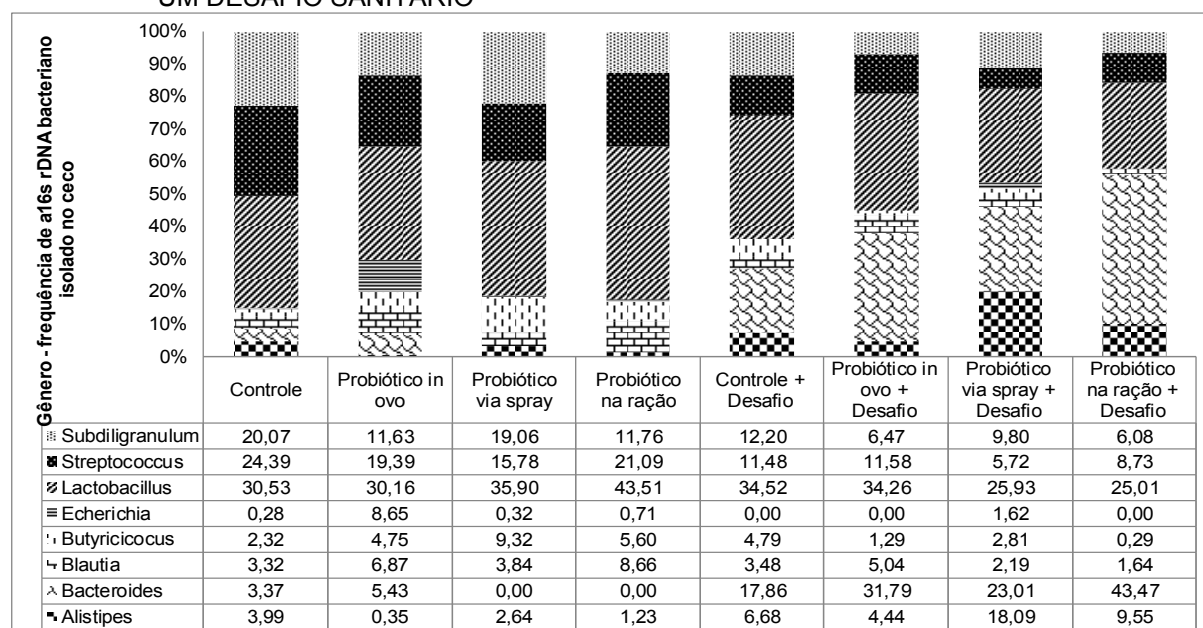


FONTE: A Autora (2017).

Para o ceco (FIGURA 10), observou-se ocorrência de maior frequência dos gêneros *Alistipes* e *Bacterioides*, ordem *Enterobacteriales*, no ceco das aves desafiadas em relação às não desafiadas. Bactérias do gênero *Bacterioides* são capazes de se fixar à camada de muco, secretar enzimas e degradar a mucina, que é uma excelente fonte de nutrientes para algumas bactérias intestinais patogênicas. Dessa forma, a presença deste gênero é importante em episódios de enterite, uma vez que competem pela utilização da mucina (PAN e YU, 2014).

Já a frequência dos gêneros *Butyricoccus* e *Subdoligranulum* da ordem *Clostridiaceae* decaiu quando as aves foram desafiadas. A ocorrência do gênero *Streptococcus* da ordem *Lactobacilates* também diminuiu quando as aves foram mantidas em desafio sanitário, enquanto que a frequência do gênero *Lactobacillus*, pertencente a essa mesma ordem, foi variável, com maior variação entre as aves desafiadas ou não que receberam o probiótico na ração. Outro gênero da ordem *Lactobacilates* (família *Enterococcaceae*), o gênero *Escherichia* foi identificado, mas com baixa frequência, com exceção ao tratamento com probiótico *in ovo* em condições sanitárias adequadas. O gênero *Blautia*, da família *Lachnospiraceae* ocorreu com frequência variável entre os tratamentos (FIGURA 10).

FIGURA 10 - GÊNERO-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S rDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO

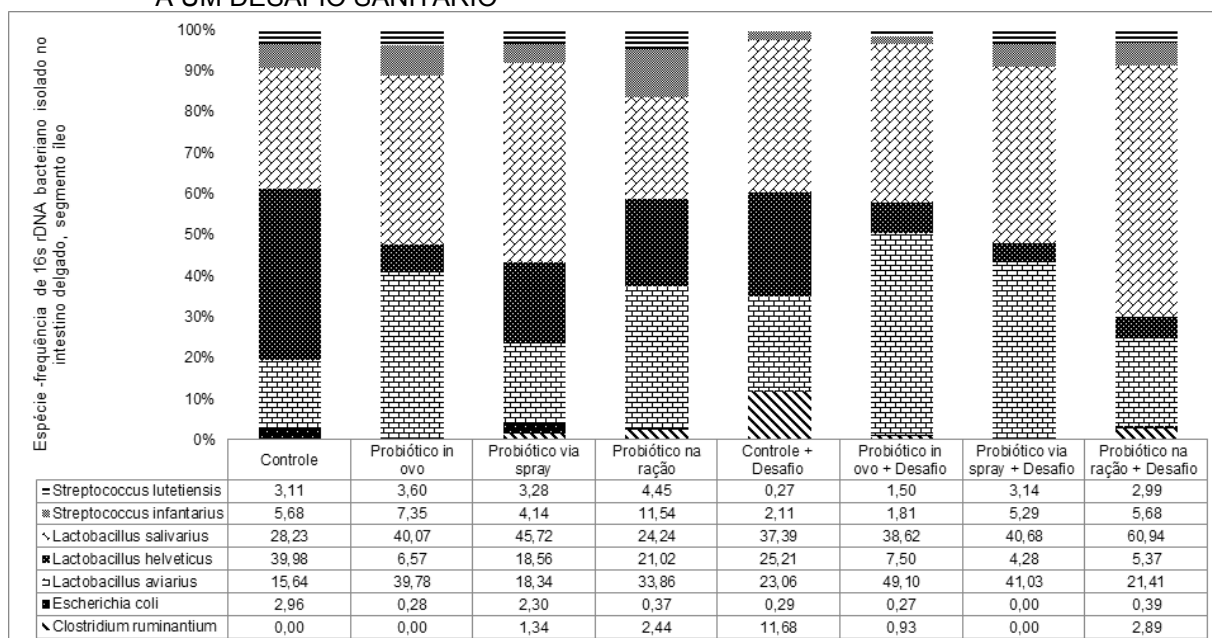


FONTE: A Autora (2017).

Lu et al. (2003) avaliaram a microbiota de frangos de corte semanalmente dos três aos 49 dias de idade e encontraram uma microbiota intestinal composta de *Lactobacillus* (70%), Clostridiaceae (11%), *Streptococcus* (6,5%), *Enterococcus* (6,5%) e a microbiota dos cecos composta de Clostridiaceae (65%), *Fusobacterium* (14%), *Lactobacillus* (8%), *Bacteroides* (5%) e outros.

No intestino delgado (FIGURA 11), identificaram-se sete espécies prevalentes, a saber: *Streptococcus lutetiensis*, *S. infantarius*, *Lactobacillus salivarius*, *L. helveticus*, *L. aviarius*, *Escherichia coli* e *Clostridium ruminatum*.

FIGURA 11 - ESPÉCIE-FREQUÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO



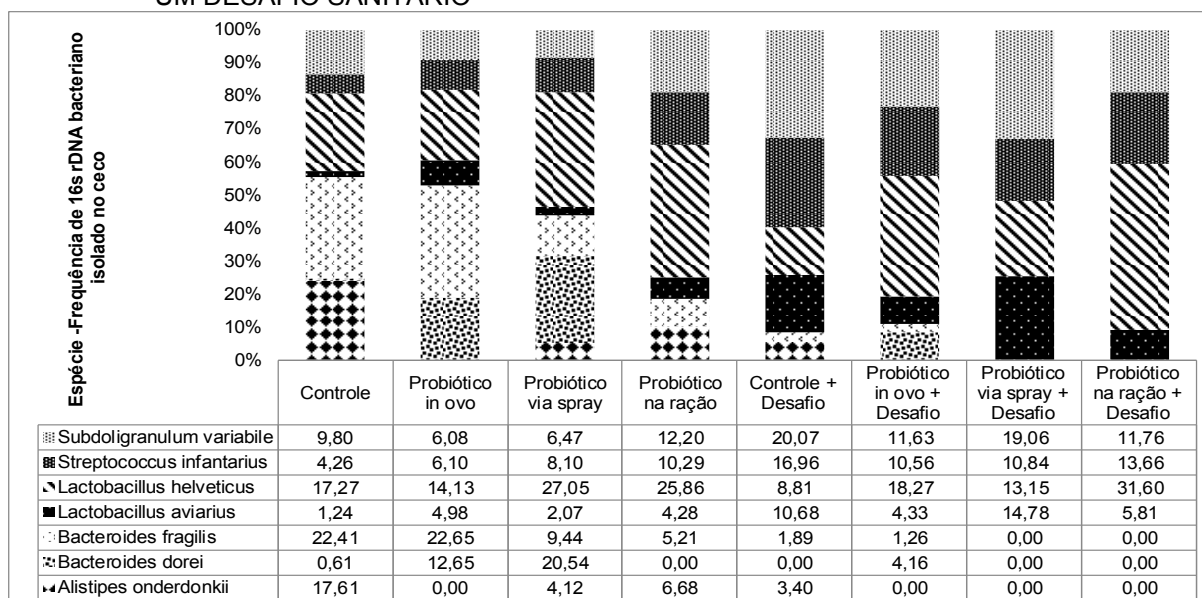
FONTE: A Autora (2017).

No ceco das aves (FIGURA 12) foram identificadas as principais espécies que foram *Subdoligranulum variable*, *Streptococcus infantarius*, *Lactobacillus helveticus*, *L. aviarius*, *Bacteroides fragilis*, *B. dorei* e *Alistipes onderdonki*.

Em aves com microbiota estabelecida, fato esse que deve ocorrer até o 21º dia de vida do animal, a presença de *Lactobacillus salivarius* predomina no intestino delgado, inglúvio, cloaca e cecos, apresentando funções benéficas contra bactérias patogênicas (ANDREATTI FILHO e SAMPAIO, 1999). Entretanto, no presente experimento, foi detectada maior frequência de *L. salivarius* apenas no intestino

delgado, segmento íleo, das aves do grupo desafiado que foi suplementado com o probiótico à base de *Bacillus subtilis* na ração.

FIGURA 12 - ESPÉCIE-FREQÜÊNCIA (%) DE 16S RDNA BACTERIANO ISOLADO NO CECO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO E SUBMETIDOS A UM DESAFIO SANITÁRIO



FONTE: A Autora (2017).

Nos grupos controle e tratamento à base de probiótico *in ovo* e sem desafio sanitário foram encontradas as maiores frequências da espécie *Bacteroides fragilis*, 22,40 e 22,65%, respectivamente. Quando esses grupos de aves foram submetidos ao desafio, apesar da menor ocorrência, ainda foram registradas 5,21 e 1,88% de frequência, ao passo que para os demais grupos que receberam o probiótico, essa espécie não foi detectada. Segundo Fernández-Canigia et al. (2012), as espécies de *Bacteroides fragilis* são as mais frequentemente isoladas em infecções clínicas que envolvem seres humanos. Além disso, essas espécies mostram-se resistentes às associações de antibióticos e com mecanismo de resistência ainda desconhecido.

Por outro lado, estudos indicam que há ação benéfica da população de *Bacteroides fragilis* no intestino animal porque esse bacilo atua como regulador natural do *Clostridium perfringens*, agindo diretamente sobre as células vegetativas e a produção de esporos. Wrigley (2004) explica que a ação benéfica da espécie de *Bacteroides fragilis* no intestino animal sobre as espécies patogênicas de *Clostridium perfringens* deve-se à ação do ácido isobutírico, produzido durante seu metabolismo.

Já, o *Lactobacillus helveticus*, a espécie de maior frequência detectada no íleo e no ceco, é uma bactéria produtora de ácido láctico, portanto relacionada com a saúde intestinal (GONG et al., 2007). As aves desafiadas do grupo controle, sem o probiótico, apresentaram a menor frequência do *Lactobacillus helveticus* no ceco quando não desafiadas. Contudo, no intestino tanto de aves desafiadas ou não, a presença do *Lactobacillus helveticus* ocorreu em maior frequência no grupo controle. Esse resultado pode ser atribuído ao fato dessa bactéria estar diretamente relacionada com a inibição do *Bacillus subtilis* (PAN e YU, 2014), probiótico utilizado no presente estudo.

A prevalência bacteriana de *Lactobacillus*, segundo Andreatti-Filho (2007), tem função benéfica no auxílio à imunidade das aves pelo estímulo à secreção de imunoglobulina IgA intestinal. No hospedeiro, conforme Barros et al. (2009), ao secretarem lactato, acetato, succinato e etanol, as bactérias desse gênero auxiliam na proliferação de outras como *Veillonella* sp., *Bacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Bacteriodes* sp, as quais, por sua vez, sintetizam ácidos graxos de cadeia curta (PAN e YU, 2014). Além disso, os *Lactobacillus* no intestino dos frangos diminuem a concentração de oxigênio, reduzem o pH e se aderem a mucosa intestinal, o que limita a possibilidade de multiplicação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Campylobacter* (ITO, MIYAJI e OKABAYASHI, 2007)

A espécie *Subdoligranulum variabile* constitui fração relevante na composição da comunidade bacteriana cecal em frangos de corte. Lund et al. (2010) e Wang, Lilburn e Yu (2016) mencionam que o ambiente de alojamento dos frangos na granja desempenha relevante papel no recrutamento e desenvolvimento dessas bactérias na microbiota cecal, o que, em hipótese, explicaria maior frequência de *Subdoligranulum variabile* no grupo desafiado devido ao baixo potencial sanitário da cama de alojamento dos frangos controle e dos que receberam probiótico via spray. Algumas espécies do gênero *Subdoligranulum* são produtoras de butirato, que é anti-inflamatório natural presente no intestino das aves. A maior presença desse gênero no ceco dos frangos submetidos ao baixo potencial sanitário sugere ser um mecanismo natural utilizado para induzir resposta inflamatória à ação de patógenos.

Torok et al. (2011) identificou grupos de bactérias potencialmente associadas ao desempenho produtivo de frangos de corte e em correlação com a manipulação de ingredientes das dietas, condições ambientais, incluindo o potencial sanitário da cama de alojamento.

Nesse mesmo sentido, Wang, Lilburn e Yu (2016) investigaram a população bacteriana intestinal em frangos de corte submetidos ao desafio sanitário com reutilização da cama do aviário. Os pesquisadores observaram que a população da microbiota presente na mucosa ileal e cecal dos frangos e nas amostras da cama de alojamento diferia percentualmente. A composição dessa microbiota, basicamente, era constituída por *Bacteroides fragilis*, *Bhtyricococcus pullicaecorum*, *Streptococcus cecorum*, *Faecalibacterium prusnitzii*, *Lactobacillus coleohominis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus vaginalis*, *Staphylococcus sciuri*, *Streptococcus alactolyticus* e *Subdoligranulum variabile*. Em termos de filogenia, a composição da população bacteriana encontrada pelos pesquisadores é muito semelhante a observada no presente experimento, especialmente entre os frangos do grupo desafiado.

Molnár et al. (2011) relataram que a suplementação dietética com probiótico a base de esporos de *Bacillus subtilis* diminuiu significativamente a população de *Escherichia coli* no íleo de frangos de corte, evitando assim quadros clínicos de enterites. Sen et al (2012) concluíram que o uso de *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento em dietas de frangos de corte pode melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e, em consequência, a saúde intestinal das aves. Mookiah et al (2014) indicaram que prebióticos e probiótico e suas combinações foram eficazes para promover melhoria no desempenho de frango de corte, principalmente, motivada pelo aumento das bactérias cecais benéficas.

Trabalhos de pesquisa são necessários a fim de identificar grupos de bactérias potencialmente associadas ao desempenho do crescimento de frangos de corte para determinar se estas bactérias são a causa ou a consequência das variações na eficiência de utilização dos alimentos.

A microbiota do intestino é atualmente reconhecida como um componente essencial do ecossistema intestinal e é referida como um “órgão esquecido” (PAN e YU, 2014). Portanto, a manipulação da microbiota intestinal por meio de intervenções dietéticas e gerenciais deve ser utilizada para melhorar o crescimento das aves e reduzir a incidência de doenças.

4 CONCLUSÃO

A utilização de probiótico contendo *Bacillus subtilis* de forma contínua na ração resultou no maior equilíbrio da microbiota intestinal e do ceco em relação às demais formas de aplicação.

O desafio sanitário alterou a diversidade e a frequência das bactérias que compõem a microbiota do ceco de forma mais evidente que a intestinal. Essa alteração é indicativo de estreita relação existente entre a microbiota intestinal dos frangos com a microbiota da cama de alojamento.

REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 3, p. 59-71, 1999.

ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. In: _____. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo, SP: Rocca Ltda, 2007, cap. 6, p. 41-51.

BARROS, M. R. et al. Transference in vitro of the resistance to the antimicrobials between *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella* enteritidis isolated from chickens. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 63, n. 5, p.1149-53, 2009.

CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-24, 2012.

DEEMING, D. C. Yolk sac, body dimensions and hatchling quality of ducklings, chicks and poults. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 560-564, 2005.

FERNÁNDEZ-CANIGIA, Liliana et al. First national survey of antibiotic susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group: emerging resistance to carbapenems in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 05622-11, 2012

GONG, J. et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 1, p. 147-157, 2007.

HERNÁNDEZ ARRANZ, N. **Diversidad genética de la mitocondria intestinal de “Thorectes lusitanicus”**. Tese (Doutorado em Veterinaria). Universidad Complutense de Madrid. España: Madrid, 2015..

HUNG, A. T. et al. Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. **Animal Production Science**, v. 52, n. 9, p. 874-79, 2012.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Aviagen Brasil**. 2007. Disponível em: <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/novembro2007-saudeintestinalemfrangosdecorte.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2017.

LUNEDO, R. **Efeito da restrição alimentar e do grupo genético sobre a microbiota do trato gastrintestinal, a expressão gênica hepática e a deposição de lipídeos na carcaça de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista; Jaboticabal, SP: Unesp. 2016

LUND, M.; BJERRUM, L.; PEDERSEN, K.. Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*-and *Subdoligranulum variable*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. **Poultry Science**, v. 89, n. 6, p. 1217-24, 2010.

LU, J. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6816-24, 2003.

MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal das aves. In: MACARI, M. et al. **Produção de frangos de corte**. 2. ed. Campinas: Facta, 2014, p. 299-320.

MOLNÁR, A. K. et al. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 52, n. 6, p. 658-65, 2011.

MOOKIAH, S. et al. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 341-348, 2014.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 108-19, 2014.

PAREDES, C. J.; ALSAKER, K. V.; PAPOUTSAKIS, E.T. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 969-78, 2005

PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, S. R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 232-37, 2005.

RINTTILÄ, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance¹. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 647-58, 2013.

ROSTAGNO, H. S. et al. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**, v. 2, 2005.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 3 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SEN, S. et al. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 1, p. 264-68, 2012.

SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H. T. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5851-5, 2010.

TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; BAN IMMENSEEL, F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, Houghton, v. 40, n. 4, p. 341-7, 2011.

TOROK, V. A. et al. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5868-78, 2011.

WANG, Y., QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**. V. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WANG, L.; LILBURN, M.; YU, Z. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 593, 2016.

WRIGLEY, D. M. Inhibition of *Clostridium perfringens* sporulation by *Bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids. **Anaerobe**, v. 10, n. 5, p. 295-300, 2004.

YIN, Y., LEI, F., LIYING, Z., LI, S., WU, Z., ZHANG, R., GAO, G. F., ZHU, B., WANG, X. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **Isme Journal**, v. 4, p. 367–76, 2010.

ZHANG, Z. F.; KIM, I. H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 2, p. 364-70, 2014.

ZHU, X. Y., ZHONG, T., PANDAYA, Y., JOERGER, R. D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the caecum of broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 68, n. 1, p.124-37, 2002.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de antibióticos promotores do crescimento na avicultura trouxe benefícios inquestionáveis, como prevenção e controle das infecções entéricas, produção de alimentos mais seguros, maior bem-estar animal, maior eficiência de produção e menor custo de produção. Entretanto, em todo o mundo, o comportamento do consumidor está passando por uma série de mudanças. O processo de globalização acelera o fluxo de informações entre as pessoas de diferentes países, permitindo que informações sobre os hábitos alimentares e preferências do consumidor se espalhem rapidamente. Essa troca de informações traz questionamentos relacionados ao bem-estar animal, se as aves ingerem promotores de crescimento ou não, entre outras preocupações como a inocuidade e segurança alimentar.

Estabilidade econômica e níveis maiores de renda permitem que os consumidores escolham qual alimento comprar, que qualidades preferem e quais influências de compra desejam satisfazer.

Essa crescente busca por uma alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem colaborado para incentivar pesquisas de novos componentes naturais biologicamente ativos e tem mudado o entendimento do papel da dieta sobre a saúde dos animais de produção.

O uso de bactérias probióticas constitui uma alternativa tecnológica que atende às exigências do consumidor atual, uma vez que não deixam resíduos na carne e não favorecem resistência às drogas. Os probióticos são aditivos constituídos por microrganismos vivos que trazem benefício à saúde intestinal através da modulação da microbiota, competição com a microbiota patogênica por nutrientes, locais de adesão no epitélio intestinal e síntese de metabólitos que criam resistência ao crescimento de organismos patogênicos e por isso podem manter os mesmos índices de produtividade alcançados com a utilização de antimicrobianos.

Além da escolha da ou do *mix* de bactérias que podem compor um probiótico, a forma de administração favorece a geração de resultados diferentes. A colonização intencional da microbiota com bactérias probióticas pode ser feita ainda no incubatório para evitar a colonização inicial da microbiota entérica dos pintos no

pós-eclosão por microrganismos patogênicos da cama de alojamento e do ambiente dos aviários comerciais.

No presente trabalho, foram testadas duas formas de inoculação de probiótico contendo *Bacillus subtilis* ainda no incubatório, antes da eclosão, *in ovo*, e no pós-eclosão, por *spray*. Outra forma avaliada foi a inclusão na ração das aves durante todo o período experimental. As diferentes formas de aplicação de probiótico alteraram principalmente a morfometria do duodeno e mostraram relação com os resultados obtidos para o desempenho produtivo, indicando que o uso contínuo do probiótico alvo na ração pode ser necessário frente aos desafios sanitários de uma criação comercial de frangos.

Além disso, observou-se que a utilização de probiótico contendo *Bacillus subtilis* de forma contínua na ração resultou no maior equilíbrio da microbiota intestinal e do ceco em relação às demais formas de aplicação do produto. Adicionalmente, comprovou-se que a diversidade e a frequência das bactérias encontradas principalmente no ceco das aves indicam estreita relação existente entre a microbiota intestinal dos frangos com a microbiota da cama. Portanto, a inclusão de probióticos é uma alternativa viável e pode ser utilizada em ampla escala produtiva, desde que associada às práticas de manejo e nutrição adequadas.

Trabalhos de pesquisa são necessários a fim de identificar grupos de bactérias potencialmente associadas ao desempenho do crescimento de frangos de corte para determinar se estas bactérias são a causa ou a consequência das variações na eficiência de utilização dos alimentos.

A microbiota do intestino é atualmente reconhecida como um componente essencial do ecossistema intestinal e é referida como um “órgão esquecido”. Portanto, a manipulação da microbiota intestinal por meio de intervenções dietéticas e gerenciais deve ser utilizada para melhorar o desempenho produtivo das aves e reduzir a incidência de doenças entéricas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. T. et al. Effects os *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora anda fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p. 1963-71, 2014.
- ALIAKBARPOUR, H. R. et al. The Bacillus subtilis and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 25, n. 9, p. 1285-93, 2012.
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, n. 7, p. 1093-8, 2004.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 91-5, 2006.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. In: _____. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo, SP: Rocca Ltda, 2007, cap. 6, p. 41-51.
- ANDREATTI FILHO, R. L. et al. Effect of cecal microflora and Lactobacillus salivarius in ovo administration used on chicken previously challenged with Salmonella enterica serovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 467-71, 2006.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 3, p. 59-71, 1999.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênica e apatogênica de Escherichia Coli em galinha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 45, p. 475-86, 1993.
- APAJALAHTI, J., KETTUNES, A., GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 2, p. 223-32, 2004
- BARROS, M. R. et al. Transference in vitro of the resistance to the antimicrobials between *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella* enteritidis isolated from chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p.1149-53, 2009.
- BLAIR, E. C. et al. Effects of Calsporin® on turkey performance, carcass yield and nitrogen reduction. **International Journal of Poultry Science**. v. 3 n.1, p 75-79, 2004.
- BOLDUAN, G. Feeding weaner pigs without feed antibiotics. **Biotechnology in the feed industry**. Nottingham University Press, p. 223-30,1999.

BORTOLUZZI, C. **Desempenho produtivo e microbiota intestinal de frangos de corte suplementados com β -ácidos do lúpulo (*Humulus lupulus*) após desafio com *Eimeria acervulina* e *E. tenella***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP: USP, 2013.

BRACARENSE, A. P. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1776-86, 2012.

CAMPOS, A. M. A. C. **Efeito da inoculação in ovo de soluções nutritivas sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia da Universidade de Viçosa. Viçosa, MG: UFV, 2007.

CAMPOS, A. M. A. et al. Effect of in ovo inoculation of nutritious solutions on the hatchability and performance of broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1712-17, 2011.

CAMPOS, A. M. A.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S. Nutrição in ovo de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**. Artigo 119, v. 7, n. 4, p.1304-13, 2010.

CAMPOS, A. M. A.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S. Nutrição in ovo de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 7, n. 4, p.1304-13, 2010.

CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-24, 2012.

CASAS, I. A.; EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R. Control of *Salmonella typhimurium* GI tract infection by GaiaFeed® and Gaiafeed® in presence of *Staphylococcus*. **Poultry Science**, v. 74 (Supplement 1), p.130, 1994.

CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159-61, 2003.

CASULA, G.; CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p 2344-52, 2002.

CAWOY, H. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 281-95, 2015.

COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, n. 6, p. 274, 2011.

CONTINI, J. P. **Óleos funcionais em dietas de frangos de corte, matrizes e progênie**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Paraná. Palotina, PR: UFPR, 2016.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CORRÊA, G. S. S. et al. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass yield of broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 467-73, 2003.

COUCH, J. R. et al. Studies on the role of biotin in embryonic development of the domestic fowl. **Poultry Science**, v. 27, p. 657, 1948.

CRESSMAN, M. D. et al. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6572-82 2010.

CRUZ, C. P. et al. Aplicação de probiótico em ovos embrionados de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Suplemento 5, p.12, 2003.

CUKROWSKA, B. et al. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 2, p. 204-9, 2002.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n.2, p. 214-20, 2011.

DE LOS SANTOS, G. I. L.; RODRIGO, J.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-47, 2005.

DE OLIVEIRA, J. E. et al. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch Salmonella susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 818-29, 2014.

DEEMING, D. C. Yolk sac, body dimensions and hatchling quality of ducklings, chicks and poults. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 560-564, 2005.

DOBROGOSZ, W. J.; BLACK B. L.; CASAS I. A. Delivery of viable Lactobacillus reuteri to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 70, p. 158, 1991.

DOS SANTOS, T. T. et al. Influence of in ovo inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2010.

EC. Council of the European Union. Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feeding-stuffs. European Commission. **News**: ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect 2003. Disponível em: <http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm>. Acesso em> 20 mar. 2017.

ESTRADA, M. A. J; HERNÁNDEZ, J. A. M.; SOTO, L. G. Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras. **Veterinaria México**, v. 41, n. 1, p. 25-43, 2010.

EZEMA, C. Probiotics in animal production: a review. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 5, n. 11, p. 308-16, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. **Animal Production and Health Paper**, n. 179. Rome, Italy: Editor Harinder P.S. Makkar, 2016.

FARIA FILHO, D. E. et al. Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 2, p. 89-98, 2006.

FARIA, D. E. et al. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, 2009.

FERKET, P. et al. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. In: **Poultry Science**, v. 84, p. 118-9, 2005.

FERKET, P., UNI, Z. Early feeding in-ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: **Anais**. Conference European Poultry 12th, Verona. Conference European Poultry, 2006 (CD-ROM).

FERNANDES, J. I. M. et al. Avaliação de extratos de plantas sobre a resposta imune, o desempenho produtivo e a morfometria intestinal de frangos de corte desafiados com *Eimeria* sp. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 18, n. 1, p. 127-39, 2017.

FERNÁNDEZ-CANIGIA, Liliana et al. First national survey of antibiotic susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group: emerging resistance to carbapenems in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 05622-11, 2012

FERREIRA, F. A. B.; KUSSUKAWA, K. C. K. Uso de probiotico na alimentação de frango de corte. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p.40-43 2008.

FLINT, J. F.; GARNER, M. R. Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 2, p. 367-78, 2009.

FOYE, O. T. **The biochemical and molecular effects of amniotic nutrient administration,"in ovo feeding" on intestinal development and function and carbohydrate metabolism in turkey embryos and poults**. Dissertation (Doctorate of Philosophy in Nutrition). Faculty of North Carolina State University. Raleigh, CN, USA, 2005.

FOYE, O. T.; BLACK, B. L. Intestinal adaptation to diet in the young domestic and wild turkey (*Meleagris gallopavo*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 143, n. 2, p. 184-92, 2006.

FOYE, O. T.; FERKET, P.; UNI, Z. The effects of in ovo feeding arginine, β -hydroxy- β -methyl-butyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2343-49, 2007.

FOYE, O. T.; UNI, Z.; FERKET, P.; Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-92, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **Anais**. V Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição. Balneário Camboriú, SC, 2004.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141 Suppl 1, n. p. S15-28, 2010.

GOMES, A. M. P; MALCATA, F. X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 1998.

GONÇALVES, F. M. et al. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 54-5, 2013.

GONG, J. et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 1, p. 147-157, 2007.

GONZALES, E. **Ação pró-nutritiva dos aditivos alimentares**. Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ UNESP, 2004.

GREEN, D. H. et al. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p.4288-91, 1999.

GUARNER, F. et al. Probióticos y prebióticos. In: **Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología**: probióticos y prebióticos, p. 1-29, 2011.

GUSILS, C.; GONZÁLEZ, S.; OLIVER, G. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. **Canadian Journal Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 981-87, 1999.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-56, 1992.

HASHEMZADEH, Z. et al. Prevention of Salmonella colonization in neonatal broiler chicks by using different routes of probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 12, p. 425-32, 2010.

HERNÁNDEZ ARRANZ, N. **Diversidad genética de la mitocondria intestinal de "Thorectes lusitanicus"**. Tese (Doutorado em Veterinaria). Universidad Complutense de Madrid. España: Madrid, 2015..

HINTON, M.; MEAD, G. C. Salmonella control in poultry: the need for the satisfactory evaluation of probiotics for this purpose. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 49-50, 1991.

HONG, H. A. et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 813-35, 2005.

HUNG, A. T. et al. Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. **Animal Production Science**, v. 52, n. 9, p. 874-79, 2012.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. **Aviagen Brasil**. 2007. Disponível em: <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/novembro2007-saudeintestinalemfrangosdecorte.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2017.

JIN, L. Z. et al. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 9, p. 397-404, 1996.

KISIELINSKI, K. et al. Simple method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical Expertise Medical**, v. 2, p.131-35, 2002.

KONEMANN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ: MEDSI, 2001.

KRUSKAL, W. H., WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p.583-621, 1952.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Probiotics on poultry production. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1457-65, 2014.

LAN, Y. et al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, n. 1, p. 95-104, 2005.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 219-25, 2010.

LEAHY, S. C. et al. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1303-15, 2005.

LEDUR, M. C.; BERTANI, G. R.; NONES, K; Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. In: **Anais**. Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. Campinas, SP: APINCO, 2003, p. 87-105.

LEE, K. W. et al. Effect of *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials on immune status in broiler chickens raised on fresh or used litter. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1592-97, 2013.

LEI, X. et al. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 28, n. 2, p. 239-46, 2015.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-8, 1965.

LIMA, A. C. F.; PIZAURO JÚNIOR, J. M.; MACARI, M. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 200-7, 2003.

LIMA, E. T. et al. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 2, p. 103, 2007.

LINZMEIER, L. G. et al. Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, a. VII, n. 12, 2009.

LODDI, M. M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p.1124-31, 2000.

LODDI, M. M. **Probióticos, prebióticos e acidificante orgânico em dietas para frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, 2003.

LOURENÇO, M. C. et al. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 11-4, 2013.

LU, J. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6816-24, 2003.

LUND, M.; BJERRUM, L.; PEDERSEN, K.. Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*-and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. **Poultry Science**, v. 89, n. 6, p. 1217-24, 2010.

LUNEDO, R. **Efeito da restrição alimentar e do grupo genético sobre a microbiota do trato gastrointestinal, a expressão gênica hepática e a deposição de lipídeos na**

carcaça de frangos de corte. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista; Jaboticabal, SP: Unesp. 2016

MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal das aves. In: MACARI, M. et al. Produção de frangos de corte. **Aves domésticas – produção de frangos de corte.** 2. ed. Campinas: Facta, 2014, p. 299-320.

MACARI, M.; LUNEDO R.; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal das aves. In: MACARI, M. et al. **Produção de frangos de corte.** 2. ed. Campinas: Facta, 2014, p. 299-320.

MAIORKA, A. et al. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 4, p. 483-92, 2003.

MARGOT, P.; KARAMATA, D. The wprA gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. **Microbiology**, v. 142, n. 12, p. 3437-44, 1996.

MATTAR, A. et al. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a caco-2 cell-culture model. **Pediatric Surgery International.** Ann Arbor, v. 18, n. 7, p. 586-90, 2002.

McBRIDE, B. W.; KELLY, J. M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 9, p. 2997-3010, 1990.

MENTEN, J. F. M.; LODDI, M. M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. **Anais.** Simpósio Sobre Ingredientes na Alimentação Animal. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. Campinas, SP, v. 2, p. 251-76, 2002.

MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. **Anais.** Conferência da Facta. Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. Santos, SP, p. 47-53, 2005.

MILLS, T. K.; LOMBARDO, M. P.; THORPE, P. A. Microbial colonization of the cloacae of nestling tree swallows. **The Auk**, p. 947-56, 1999.

MOLNÁR, A. K. et al. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 52, n. 6, p. 658-65, 2011.

MOOKIAH, S. et al. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 341-348, 2014.

MORAN, E. T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1043-49, 2007.

MURSHED, M. A.; ABUDABOS, A. M. Effects of the dietary inclusion of a probiotic, a prebiotic or their combinations on the growth performance of broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. SPE, p. 99-103, 2015.

NISBET, D. J. et al. Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to Salmonella Typhimurium. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 1, p. 12-5, 1994.

NOY, Y.; GEYRA, A.; SKLAN, D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. **Poultry Science**, v. 80, n. 7, p. 912-9, 2001.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, p. G807-G19, 2010.

OLIVEIRA, J. E. et al. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch Salmonella susceptibility. **Poultry science**, v. 93, n. 4, p. 818-29, 2014.

OLNOOD, C. G. et al. Delivery routes for probiotics: Effects on broiler performance, intestinal morphology and gut microflora. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 192-202, 2015.

OTUTUMI, L. K. et al. Different ways of administering probiotic on performance, yield carcass and small intestine microbial population of meat quail. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 158-164, 2010.

OTUTUMI, L. K. et al. Variations on the efficacy of probiotics in poultry. **INTECH** Open Access Publisher, p. 203-39, 2012.

OVIEDO-RONDON, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 209-25, 2009.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbe**, v. 5, n. 1, p. 108-19, 2014.

PANDA, A. K.; REDDY, M. R.; PRAHARAJ, N. K. Dietary supplementation of probiotic on growth, serum cholesterol and gut microflora of broilers. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 235-40, 2006.

PAREDES, C. J.; ALSAKER, K. V.; PAPOUTSAKIS, E.T. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 969-78, 2005

PEDROSO, A. A. et al. Remodeling the intestinalecosystem toward better performance and intestinal health. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, p. 432-4, 2012.

PEDROSO, A. A. Microbiota do trato digestório: transição do embrião ao abate. In: **Anais. Conferência Apinco Facta**, 2011, Santos. São Paulo, p. 123-30, 2011.

PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, S. R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 232-37, 2005.

PELICANO, E. R. L. et al. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 5, n. 3, p. 207-214, 2003.

PESSÔA, G. B. S. et al. New concepts in poultry nutrition. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 755-74, 2012.

RAMOS, L. S. N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frangos de corte**. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Teresina, PI, 2009.

RINTTILÄ, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 647-58, 2013.

ROSA, G. J. de M.; ROCHA, L. B. da; FURLAN, L. R. Microarray gene expression studies: experimental design, statistical data analysis, and applications in livestock research. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 186-209, 2007.

ROSTAGNO, H. S. et al. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**, v. 2, 2005.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 3 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

ROTO, S. M.; KWON, Y. M.; RICKE, S. C. Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. **Frontiers in veterinary science**, v. 3, 2016.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal, SP: Funep, 2007.

SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics: a review. **International journal of food microbiology**, v. 44, n. 1, p. 93-106, 1998.

SANTOS, E. **Aditivos alternativos ao uso de antibiótico na alimentação de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2003.

SANTOS, M. J. B. et al. Manejo e tratamento de cama durante a criação de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, Artigo 164, v. 9, n. 3 p. 1801-15, 2012.

SANTOS; J. R. G.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 741-47, 2005.

SAS. Institute Inc. **Software and services**: system for Windows, version 8.0 software Cary, US, 2002.

SCHNEITZ, C. Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poultry Science**, v. 71, n. 12, p. 2125-8, 1992.

SCHNEITZ, C. et al. Competitive exclusion in the young bird: challenge models, administration and reciprocal protection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 3-4, p. 241-44, 1992.

SCHNEITZ, C. et al. Droplet application for protecting chicks against Salmonella colonisation by competitive exclusion. **Veterinary Record**, v. 126, n. 20, p.510, 1990.

SEN, S. et al. Effect of supplementation of Bacillus subtilis LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 1, p. 264-68, 2012.

SEUNA, E.; RAEVUORI, M.; NURMI, E. An epizootic of Salmonella typhimurium var. copenhagen in broilers and the use of cultured chicken intestinal flora for its control. **British Poultry Science**, v. 19, n. 3, p. 309-314, 1978.

SHANMUGASUNDARAM, R.; LILBURN, M. S.; SELVARAJ, R. K. Effect of recycled litter on immune cells in the cecal tonsils of chickens. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 95–100, 2012.

SILVA, E. N.; ANDREATTI, R. L. F. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: **Anais. II Simpósio da Sanidade Avícola**, v. 1, p. 45-55, 2000.

SILVA, W. T. M. et al. Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, PR, v. 33, n. 1, p.19-24, 2011.

SKLAN, D.; GEYRA, A.; TAKO, E. et al. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 747-53, 2003.

SLEPECKY, R. A.; HEMPHILL, H. E. The genus bacillus-nonmedical. **Prokaryotes**, v. 4, p. 530-62. 2006. Chapter 1.1.16.

STERZO, E. V. et al. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control Salmonella enterica serovar Enteritidis experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n.1 p. 69-73, 2007.

SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H. T. Effects of Bacillus subtilis natto on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5851-5, 2010.

SWANN, M. M et al. **Report of the joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine**. London: Her Majesty's Stationer Office, 1969.

TACTACAN, G. B. et al. A *Bacillus subtilis* (QST 713) spore-based probiotic for necrotic enteritis control in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 4, p. 825-31, 2013.

TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 2023-8, 2004.

TEO, A.; TAN, H. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 3, p. 296-303, 2007.

TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; BAN IMMENSEL, F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, Houghton, v. 40, n. 4, p. 341-7, 2011.

TIMMERMAN, H. M. et al. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. **Poultry Science**, v. 85, n. 8, p. 1383-88, 2006.

TOROK, V. A. et al. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5868-78, 2011.

UNI, Z. et al. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v.84, n.5, p.764-70, 2005.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 1, p. 101-11, 2004.

VAN DER HOEVEN-HANGOOR, E. et al. Moisture content in broiler excreta is influenced by excreta nutrient contents. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 12, p. 5705-13, 2013.

VIEIRA, S. L. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2007.

WANG, L.; LILBURN, M.; YU, Z. Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 593, 2016.

WANG, Y., QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**. V. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1694, n. 1, p. 299-310, 2004.

WOLFENDEN, A. D. et al. Evaluation of spray application of a Lactobacillus-based probiotic on Salmonella enteritidis colonization in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 493-96, 2007.

WONG, S. L.; YE, R.; NATHOO, S. Engineering and production of streptokinase in a Bacillus subtilis expression-secretion system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 517-23, 1994.

WRIGLEY, D. M. Inhibition of Clostridium perfringens sporulation by Bacteroides fragilis and short-chain fatty acids. **Anaerobe**, v. 10, n. 5, p. 295-300, 2004.

WU, X.C. et al. Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered Bacillus subtilis expression-secretion system. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 1, p. 71-6, 1993.

YANG, M. J. et al. Expression of a Bacillus subtilis endoglucanase in protease-deficient Bacillus subtilis strains. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 430-34, 2004.

YE, R. et al. High- level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from Bacillus subtilis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 87-96, 1999.

YIN, Y. et al. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **Isme Journal**, v. 4, p. 367-76, 2010.

ZHANG, Z. F.; KIM, I. H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 2, p. 364-70, 2014.

ZHOU, M. et al. Effects of Bacillus licheniformis on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 48, 2016.

ZHU, X. Y. et al. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the caecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p.124-37, 2002.

ZHU, X. Y., ZHONG, T., PANDAYA, Y., JOERGER, R. D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the caecum of broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 68, n. 1, p.124-37, 2002.

ZOCCO, M. A. et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 8, p. 707-12, 2007.