

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS DE FRANGOS CAIPIRA
E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PROBIÓTICO EM FRANGOS DE CORTE**

DIEGO BATISTA XAVIER

ORIENTADOR: DR. FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL

CO-ORIENTADOR: DR. RICARDO TITZE DE ALMEIDA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 29D/2010

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2010**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

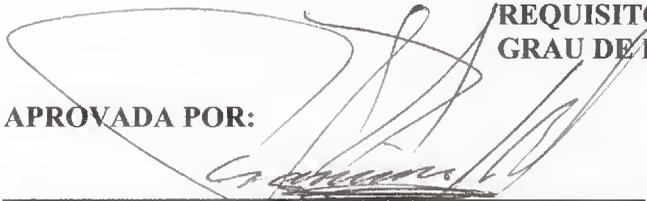
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

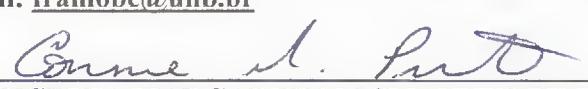
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS DE FRANGOS
CAIPIRA E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL PROBIÓTICO EM FRANGOS DE
CORTE

DIEGO BATISTA XAVIER

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS

APROVADA POR:


FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL, DR. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA) (ORIENTADOR) E-
mail: framobe@unb.br


CONCEPTA MARGARET MACMANNUS PIMENTEL, PhD (UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA – FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA)
(EXAMIDORA INTERNA) E-mail: concepta@unb.br


NELSON RODRIGO DA SILVA MARTINS, PhD (UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS – ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG) (EXAMINADOR
EXTERNO) E-mail: nrsmart@gmail.com


BERGMAN MORAES RIBEIRO, DR. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS) (EXAMINADOR EXTERNO) E-mail: bergmann@unb.br


MARCOS BARCELLOS CAFÉ, DR. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS –
ESCOLA DE VETERINÁRIA) (EXAMINADOR EXTERNO) E-mail: mcafe@vet.ufg.br

BRASÍLIA/DF, 26 de Março de 2010

À Deus, meu orientador, guia e amigo sempre presente sem o qual nada teria feito. Aos meus pais, que sempre incentivaram e apoiaram meus sonhos e decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, e por ter me dado esta oportunidade.

Aos meus pais, Geferson e Angela, a quem devo tudo o que sou e conquistei nestes anos.

Aos meus irmãos Rafael e Danilo pelo apoio dado nas horas difíceis e por compartilhar os bons momentos. A toda minha família, primos, tios e tias pela alegria e carinho em todos os anos.

Aos verdadeiros amigos que me acompanharam durante esta jornada, que sempre estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos, e em especial aos mais presentes: família Reis, 714, 7^a turma de veterinária UnB.

Aos professores que dedicaram seu tempo ao ensino e pesquisa, em especial ao Francisco Ernesto Moreno Bernal, meu orientador, ao Ricardo Titze de Almeida, meu co-orientador e à Concepta Margaret Macmannus Pimentel, fundamental no desenho experimental e análise estatística, que além de ótimos professores se tornaram bons amigos.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia: Mariana de Fátima Góes Cesar, Ana Paula de Paiva Faria, que compartilharam esse período de pesquisa, pela paciência, disposição, atenção e oportunidade de aprendizagem a mim oferecidas.

Às alunas de graduação Bárbara, Marina e Aline, pela participação e ajuda em importantes etapas do experimento. À SADIA S.A. pelo fornecimento de ovos férteis.

Aos demais departamentos e laboratórios que apoiaram esta pesquisa: Microbiologia Clínica Veterinária - UnB, Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – UNIFESP, Laboratório de Biologia Molecular – UnB, Laboratório de doença das Aves – UFMG, Laboratório de Microbiologia – UFMG, Laboratório de Patologia – UnB, Departamento de Antropologia Biológica de Cambridge e aos seus coordenadores e funcionários, em especial à Simone Perecmannis, Hudson de Holanda, Vinícius Drumond, Nara Rúbia, Pedro d’Azevedo, Antonio Pignatari, Nelson Martins, Marcio Botelho, Mirna, Vanessa, João Luiz Moreira, Álvaro Cantini, Leslie Knapp, Anabela Pinto, entre outros.

À Universidade de Brasília, à coordenação, à secretaria e demais membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, pela formação e apoio estrutural; ao Programa de colaraboração acadêmica (PROCAD), à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do presente trabalho. Ao British Council por todo auxílio fornecido durante estágio realizado na Universidade de Cambridge, Department of Biological Anthropology.

ÍNDICE

	RESUMO	viii
	ABSTRACT	ix
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
	LISTA DE TABELAS	xi
	LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xii
	CAPÍTULO I	1
1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo Geral	4
2.2	Objetivos Específicos	4
2.3	Hipóteses	5
3	REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1	Produção de frangos	6
3.2	Probióticos	7
3.2.1	Características dos probióticos	8
3.2.2	Mecanismos de ação	8
3.2.3	Probióticos e avicultura	9
3.3	Bactérias utilizadas no experimento	12
3.3.1	<i>Lactobacillus</i> spp	12
3.3.2	<i>Enterococcus</i> spp	13
3.3.3	<i>Bacillus subtilis</i>	14
3.4	Trato Gastrointestinal de frangos	14
	CAPÍTULO 2 – Isolamento de cepas e caracterização probiótica	16
1	RESUMO	16
2	INTRODUÇÃO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Enterococos	18
3.1.1	Indivíduos e coleta de amostras	18
3.1.2	Reação de polimerização em cadeia – PCR multiplex	19
3.1.3	Eletoforese em gel de campo pulsado - PFGE	20
3.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	21
3.2.1	Indivíduos e coleta de amostras	21
3.2.2	Reação de polimerização em cadeia - PCR	22
3.3	<i>Bacillus subtilis</i>	22
3.3.1	Preparo de amostras fecais, isolamento bacteriano e condições de crescimento	22
3.4	Caracterização Probiótica	23
3.4.1	Resistência ao suco gástrico artificial	23
3.4.2	Tolerância aos sais biliares	23
3.4.3	Antagonismo	24
3.5	Análise estatística	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Indivíduos, coletas de amostras e identificação das cepas	25
4.1.1	<i>E. gallinarum</i> e <i>E. faecalis</i>	25
4.1.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	27

4.1.3	<i>Bacillus subtilis</i>	28
4.2	Caracterização probiótica <i>in vitro</i>	28
4.2.1	Teste de antagonismo <i>in vitro</i> de microrganismos isolados de frangos caipira	29
4.2.2	Resistência ao Suco Gástrico artificial	30
4.2.3	Inibição por sais biliares	32
5	CONCLUSÃO	38
	CAPÍTULO 3 – Caracterização probiótica <i>in vivo</i>	39
1	RESUMO	39
2	INTRODUÇÃO	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Testes <i>in vivo</i>	41
3.1.1	Inoculação <i>in ovo</i>	41
3.1.2	Colonização de frangos até 23 dias	44
3.1.2.1	Pesagem	46
3.1.2.2	Histomorfometria	46
3.1.2.2.1	Processamento dos Materiais	46
3.1.2.2.2	Coloração das Lâminas	47
3.1.2.2.3	Análises histológicas	47
3.1.2.3	Análise microbiológica	52
3.1.3	Análise estatística	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Testes <i>in vivo</i>	53
4.1.1	Inoculação <i>in ovo</i>	53
4.1.2	Colonização dos frangos até os 23 dias de idade	54
4.1.2.1	Análise microbiológica	54
4.1.2.2	Aparência do lote	58
4.1.2.3	Pesagem dos animais	59
4.1.2.4	Histologia do TGI	60
4.1.2.4.1	Intestino Delgado	61
4.1.2.4.2	Intestino Grosso	61
4.1.2.4.3	Ceco	62
4.1.2.4.4	Papo	62
5	CONCLUSÃO	65
	Produtos, impactos e importância eventual para o DF	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXOS	77

RESUMO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS OBTIDAS DE FRANGOS CAIPIRA E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL PROBIÓTICO EM FRANGOS DE CORTE. Diego Batista Xavier, Francisco Ernesto Moreno Bernal, Dr., Brasília, Distrito Federal.

O presente estudo teve como objetivo testar cepas promissoras de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus gallinarum* e *E. faecalis*, aplicando-se metodologias de isolamento seletivo, identificação molecular e caracterização probiótica. As bactérias em questão foram submetidas a teste *in vivo* (inoculação *in ovo* e fornecimento direto), analisando-se o efeito nos ovos e frangos inoculados (eclodibilidade, ganho de peso), aspectos microbiológicos e alterações na histologia intestinal. Os resultados mostraram que as metodologias de isolamento e identificação foram eficientes para seleção das diferentes bactérias propostas. Os testes *in vitro* para a caracterização probiótica demonstraram que o *B. subtilis*, na forma vegetativa tem baixa resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares. A cepa de *L. acidophilus* por outro lado, apresentou bons resultados, com alta resistência ao suco gástrico artificial e baixa taxa de inibição por sais biliares. Foi ainda a única cepa com resultado positivo para ação antagônica contra *Salmonella enteritidis*. A análise dos isolados de enterococos demonstrou que diferentes espécies, genogrupos e o local de isolamento podem influenciar na caracterização probiótica das bactérias. Todos os isolados de enterococos mostraram de baixa a moderada inibição por sais biliares, reforçando a proposição de que *E. faecalis* e *E. gallinarum* podem ser alternativas interessantes ao normalmente utilizado *E. faecium* para a construção de probióticos. Considerando-se os testes realizados *in vivo*, foi demonstrado que a inoculação *in ovo* é um procedimento eficaz para colonização intestinal por bactérias probióticas, com boas taxas de recuperação nos primeiros dias de vida. Os enterococos e os lactobacilos estudados são eficientes em colonizar o intestino das aves, mas sua manutenção nesse ambiente como bactérias dominantes dura poucos dias, fazendo-se necessária a administração freqüente para que os efeitos sejam obtidos. Não foram notadas diferenças significativas no ganho de peso dos animais, mas na histologia, o uso das bactérias probióticas colaborou para o aumento da altura das vilosidades do intestino delgado e da profundidade das criptas. Por fim, verificou-se que a combinação das bactérias analisadas pode ser uma boa alternativa uma vez que explorará as principais características de cada uma delas.

Palavras chave: Probiótico, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *B. subtilis*, Frangos.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA STRAINS FROM CHICKENS OBTAINED FROM NON INTENSIVE SISTEMES AND EVALUATION OF ITS PROBIOTIC POTENCIAL IN POULTRY. Diego Batista Xavier, Francisco Ernesto Moreno Bernal, Dr., Brasília, Distrito Federal.

The present study aimed to test promising strains of *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus gallinarum* and *E. faecalis*, applying the methods of selective isolation, molecular identification and probiotic characterization for chickens. The candidate bacteria were submitted to *in vivo* tests (*in ovo* inoculation and direct catering) for the analysis of productivity (eclobility, weight gain), microbiologic aspects and histologic changes of the gastrointestinal tract. The data showed that the isolation and identification methods were efficient on the bacteria selection. The *in vivo* tests used for probiotic characterization demonstrated that *B. subtilis*, on the vegetative form has low resistance to gastric acids and biliar salts. On the other hand, the *L. acidophilus* strain presented high resistance to gastric acids and low inhibition to biliar salts. The lactobacilli strain also revealed positive antagonic action against *Salmonella enteritidis*. The enterococci results demonstrated that different species, genogroups and sites of isolation may interfere in probiotic characterization. All enterococci samples used in this study presented from low to moderate biliar salt inhibition, reenforcing the proposition that *E. faecalis* and *E. gallinarum* may be good alternatives to the usually used *E. faecium*. *In vivo* tests were essential, characterizing the *in ovo* inoculation as an efficient method, successfully colonizing the chicken's intestine with good recovery rates in the first and second days of life. Enterococci and lactobacilli did not have the ability to maintain themselves as dominant bacteria for more than three days, meaning that they must be continuously fed to poultry if probiotic effects are desired. No significant differences were obtained in weight gain analysis, but in the histologic verification, bacteria mix probiotic improved intestine vilosities height and crypt depth. The bacteria combination tested in this study seems to be a good alternative, as it can explore de main characteristics of each strain selected.

Key words: Probiotic, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *B. subtilis*, chicken.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 1% de isolados de enterococos do presente estudo	26
Figura 2	Eletroforese em gel de cabo pulsado de amostras de <i>Enterococcus gallinarum</i> obtidas de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal	27
Figura 3	Halo de inibição do crescimento de <i>Salmonella enteritidis</i> por <i>Lactobacillus acidophilus</i>	30
Figura 4	Concentração de bactérias incubadas na ausência de sais biliares.	33
Figura 5	Concentração de bactérias incubadas na presença de sais biliares.	34
Figura 6	Concentração de <i>Bacillus subtilis</i> com e sem sais biliares	34
Figura 7	Concentração de <i>E. faecalis</i> (isolado do Papo) com e sem sais biliares	35
Figura 8	Concentração de <i>E. faecalis</i> isolado do ID com e sem sais biliares	35
Figura 9	Concentração de <i>E. gallinarum</i> F3 (isolado de swab cloacal) com e sem sais biliares	36
Figura 10	Concentração de <i>E. gallinarum</i> F15 (isolado de swab cloacal) com e sem sais biliares	36
Figura 11	Concentração de <i>L. acidophilus</i> (isolado do ceco) com e sem sais biliares	37
Figura 12	Ovoscópio utilizado para verificação de viabilidade embrionária e marcação da câmara de ar	42
Figura 13	Ovo submetido à ovoscopia	43
Figura 14	Inoculação <i>in ovo</i> de 0,1ml de probiótico, utilizando-se seringa de 1ml.	43
Figura 15	Corte histológico: Intestino Delgado (curva da alça duodenal)	48
Figura 16	Corte histológico: Intestino Grosso (reto)	49
Figura 17	Corte histológico: Ceco	50
Figura 18	Corte histológico: Papo	51
Figura 19	Pinto de um dia demonstrando não internalização do saco vitelínico	54
Figura 20	<i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp no grupo 5 (mix probiótico) na diluição de 10^{-6}	57
Figura 21	Animal do grupo 4 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) apresentando cloaca “suja”.	58
Figura 22	Peso médio (gramas) dos animais nos dias 0, 1, 5, 9, 12, 15 e 18.	69
Figura 23	gráfico de dispersão: idade relacionada às diferentes medidas dos cortes do TGI	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais bactérias probióticas utilizadas na produção animal	11
Tabela 2	Oligonucleotídeos (primers) e genes alvo utilizados para reação de PCR para enterococos	20
Tabela 3	Concentração de células dos diferentes isolados na OD _{600nm} de 0,6.	28
Tabela 4	Resistência ao Suco Gástrico artificial: número de UFC's e percentual de inibição após tratamento com suco gástrico artificial.	32
Tabela 5	Percentual de inibição por sais biliares em leitura por espectrofotômetro na OD _{600nm} após seis horas de incubação	33
Tabela 6	Eclodibilidade, mortalidade pós-nascimento e principais problemas relacionados nos diferentes grupos estudados.	53
Tabela 7	Duração (dias) da colonização intestinal após inoculação “ <i>in ovo</i> ” aos 18 dias de incubação.	56
Tabela 8	Peso médio (gramas) das aves nos dias 0, 1, 5, 9, 12, 15 e 18	60
Tabela 9	Medidas histológicas de diferentes trechos do TGI de frangos submetidos à diferentes tratamentos com bactérias probióticas	64
Tabela 10	Medidas histológicas de diferentes trechos do TGI de frangos um (id19) e quatro (id23) dias após o fornecimento do probiótico	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

% - por cento

μ - micro

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTP - 2'-desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

E. faecium - *Enterococcus faecium*

E. gallinarum - *Enterococcus gallinarum*

g - grama

h - horas

L - litro

L. acidophilus - *Lactobacillus acidophilus*

m - mili

M - molar

nm - nanômetro

°C - graus Célsius

OD - "optical density" / densidade óptica

pb / bp - pares de bases

PCR - "polymerase chain reaction" / reação em cadeia da polimerase

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis / Gel de Eletroforese em Campo Pulsado

TGI - trato gastrointestinal

UFC - unidades formadoras de colônia

UV - ultra violeta

V - volts

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A avicultura é um dos setores da agropecuária que mais tem crescido nas últimas décadas. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2009), a produção mundial de frangos cresceu sistematicamente nos últimos 30 anos, passando de 7,47 milhões de toneladas em 1970, para 40 milhões de toneladas no final do século XX. O Brasil, que no início do século XXI tornou-se o maior exportador mundial deve estar atento ao mercado cada vez mais exigente. A competição pelo mercado internacional da carne de frango é muito intensa, com isto, padrões altos de qualidade são fundamentais para garantir preços melhores e a manutenção dos compradores.

A produção de alimentos saudáveis e nutritivos em grande quantidade tem se tornado um desafio para todos os profissionais que trabalham na cadeia produtiva alimentícia. Para que a atividade de criação de frangos mantenha sua eficiência, com a geração de lucros, muitos aditivos (incluindo promotores de crescimento, como drogas antimicrobianas) têm sido incorporados às rações dos animais, com objetivo de melhorar o processo digestivo, resultando na redução do número de doenças e na melhora do desempenho zootécnico das aves (Vahjen et al., 2002, Decroos et al., 2004).

Entretanto, a conscientização sobre o uso inadequado destes produtos (drogas antimicrobianas) e os possíveis transtornos causados à saúde destes animais e do homem tem aumentado nos últimos anos. O Brasil, por exemplo, utiliza promotores de crescimento em aproximadamente 95% dos lotes comerciais de frango de corte (Simons, 2005). É importante destacar que os antimicrobianos podem alterar a microbiota do trato digestivo e, além da saúde da ave, a presença de baixas concentrações destes, pode resultar em alguns casos, na obtenção de resistência bacteriana aos mesmos. Microrganismos resistentes a uma ou várias drogas têm surgido, aumentando ainda mais a preocupação tanto na produção animal quanto na saúde pública mundial (Joint WHO/FAO/OIE, 2002).

Considerando essa situação, alimentos funcionais podem ser utilizados como uma alternativa ao uso de antibióticos na ração de aves, favorecendo a formação de uma microbiota saudável e equilibrada, reforçando a probiose do trato intestinal.

Probiose é a capacidade dos microorganismos normais do trato intestinal de resistir ao crescimento exagerado de cepas normais e ao estabelecimento de cepas invasivas. Os probióticos, classificados dentro dos alimentos funcionais, são utilizados então para reforçar ou restabelecer esta probiose quando for quebrada por fatores adversos (Loddi, 2002). Diversos estudos relataram que o uso de bactérias com potencial probiótico na produção animal tem vantagens comprovadas na fisiologia e desempenho, atuando ainda na diminuição de microorganismos indesejáveis (Netherwood et al., 1999, Carina Audisio et al., 2000, Vahjen et al., 2002, Decroos et al., 2004).

Há probióticos com diferentes composições de microorganismos e, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie podem ter diferentes cepas. A eficácia do produto é estritamente dependente da quantidade e características das cepas do microorganismo utilizado na elaboração do produto a ser utilizado como aditivo alimentar. (Jin et al., 1997)

Um bom probiótico deve sobreviver às condições do trato gastrintestinal e ter condições de permanecer no ecossistema intestinal; não deve ser tóxico nem patogênico para o homem ou para os animais; deve ser estável durante a estocagem e permanecer viável por longos períodos; e deve ter capacidade antagônica às bactérias intestinais indesejáveis, promovendo efeitos comprovadamente benéficos ao hospedeiro (Gibson & Roberfroid, 1995).

As bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio, que têm ação bacteriana especialmente em relação às bactérias patogênicas. As bacteriocinas são substâncias antibióticas de ação local, que inibem o crescimento de patógenos intestinais. As bactérias ácido-lácticas (como os enterococos e os lactobacilos) produzem nisina, diplococcina, lactocidina, bulgaricina e reuterina. Estas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias gram-negativas quanto para gram-positivas, como a *Salmonella* spp., *E. coli* e *Staphylococcus* spp. (Loddi, 2002)

Os probióticos podem conter bactérias caracterizadas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas. *Enterococcus*, *Bacteróides*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes em misturas de culturas definidas. Esporos de *Bacillus subtilis* também vêm sendo utilizados para bacterioterapia e bacterioprophilaxia tanto para animais como para humanos (Hoa et al., 2000; Loddi, 2002). Dentre esses microorganismos, apenas isolados de *Enterococcus faecium* e *Bacillus* spp. tem seu uso permitido na União Européia. Ressalta-se

ainda que existem diferenças nas quantidades de cada uma destas bactérias na microbiota do TGI de aves; *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. por exemplo, são encontrados em altas concentrações (Guillot, 2001, Nicolli et al., 2003).

Quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas e/ou liofilizadas, algumas das suas propriedades são perdidas. Por outro lado, não se conhece, ainda, nem a composição total, nem a melhor combinação entre as que melhor estimularam as propriedades probióticas “in vivo” (Loddi, 2002).

Estudos verificaram que a administração de probiótico misto com cepas dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* influencia as performances zootécnicas e a composição microbiana das fezes de aves jovens. Na contagem de amostras fecais pode ser notado decréscimo na população de *Clostridium* (Decroos, 2004). Outros trabalhos relataram a resposta no ganho de peso de aves tratadas com probiótico composto por essas bactérias, atestando que houve resultado positivo para essa combinação (Tournut, 1998).

Os enterococos utilizados como probióticos mostram ainda ação estimulante de outras bactérias de ácido láctico (aumento contínuo da concentração de lactato) no intestino delgado, especialmente *Lactobacillus*; mudando a estrutura da comunidade bacteriana (Netherwood, 1999, Vahjen, 2002); enterococos também mostraram ação inibitória do crescimento de *Salmonella pullorum*, porém, animais tratados após a infecção não responderam bem, mostrando que esse probiótico é ideal para prevenção não mostrando boa ação como agente terapêutico (Carina Audisio, 2000). A grande maioria dos probióticos produzidos para aves tem se caracterizado por conter *Enterococcus faecium* em sua composição (Netherwood et al., 1999, Carina Audisio et al., 2000, Vahjen et al., 2002, Decroos et al., 2004), porém sabe-se que em aves, há uma prevalência similar ou maior de *E. faecalis* e *E. gallinarum* (Günter Klein, 2003, Xavier et al, 2006).

A partir do conhecimento dessas diferentes espécies e das características de cada uma, há possibilidade de identificar linhagens com potencial probiótico destinadas a aves de produção. A elaboração de probiótico misto poderá ainda explorar as características favoráveis de cada bactéria. No presente estudo serão testadas cepas promissoras de:

- a) *Bacillus subtilis* – uso permitido na União Européia associado à características probióticas favoráveis.
- b) *Lactobacillus acidophilus* – encontrado em quantidades elevadas na microbiota do TGI de aves e com características probióticas já bem descritas.

c) *Enterococcus gallinarum* e *E. faecalis* – utilização como probiótico ainda não explorada; é importante o conhecimento do real potencial probiótico destas espécies, também encontradas em elevadas quantidades no TGI de aves.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um probiótico misto a partir de *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus gallinarum* e *E. faecalis* isolados de frangos caipiras através da seleção das linhagens com características de colonização intestinal favoráveis, para posterior utilização em frangos de corte.

2.2 Objetivos Específicos

Realizar isolamento seletivo, identificação molecular e teste de variabilidade genética das estirpes de enterococos isoladas.

Realizar isolamento seletivo e identificação molecular para as estirpes de *Lactobacillus acidophilus*.

Padronizar metodologia de isolamento seletivo, identificação e caracterização molecular, para cepas de *Bacillus subtilis*.

Realizar testes de caracterização probiótica nos isolados escolhidos para compor o probiótico multiespécie: inibição ao HCl artificial e inibição por sais biliares.

Testar in vitro a ação de cada estirpe quanto ao crescimento de salmonela.

Verificar os índices zootécnicos como, ganho de peso e mortalidade após administração de estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *E. gallinarum*, isoladas e em mix probiótico, onde todas estarão presentes.

Verificar alterações histológicas no TGI das aves tratadas com *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *E. gallinarum*.

2.3 Hipóteses

As cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *E. gallinarum* isoladas de frangos caipira possuem características probióticas favoráveis à utilização em aves produzidas industrialmente.

A utilização do probiótico misto de *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *E. gallinarum* contribui para um melhor desempenho produtivo e prevenção contra *Salmonella* spp. em frangos de corte.

A administração de cada bactéria (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *E. gallinarum*), isolada ou associada às demais, promove a manutenção das características histológicas do TGI de frangos de corte.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de frangos

Mesmo sob o impacto da crise econômica que ocorreu nos cinco continentes em outubro de 2008, a produção mundial de carne de frango registrou crescimento de 4,5%, pouco abaixo dos 6,2% registrados em 2007, totalizando 71,2 milhões de toneladas, segundo dados do United States Department of Agriculture (USDA, 2009). O Brasil encontra-se no terceiro lugar do ranking, com 10,9 milhões de toneladas, auferindo um crescimento de 6,2%, precedido pela China, com 11,9 milhões de toneladas, e Estados Unidos, em primeiro lugar com seus 16,6 milhões de toneladas, com crescimentos respectivos de 5,4 e 2,1%.

Foram totalizados embarques de carcaças inteiras ou parte de frangos de corte que corresponderam a 8,4 milhões de toneladas, o crescimento de 13,7% no volume de exportações mundiais mostra que o setor não se deixou abater pela crise. Com o maior volume individual, o Brasil lidera o ranking com 3,6 milhões de toneladas exportadas, registrando um crescimento de 10,9%. Estados Unidos e União Européia mantiveram-se em 2º e 3º lugar, com volumes de 3,2 e 0,7 milhão de toneladas respectivamente e crescimentos significativos de 17,5 e 16,5%. Para a China o ano terminou com uma queda de 20,4% nos embarques, que tiveram uma redução de 0,7 milhão em relação ao ano anterior (ABEF, 2009).

A produção de alimentos saudáveis em grande escala é considerada um desafio diário para os profissionais que trabalham com a cadeia produtiva alimentícia. Para atender a grande demanda de alimentos de origem animal, os pesquisadores têm se esforçado na busca de novas tecnologias a fim de aumentar a eficiência e a produtividade dos animais de produção. Nesse aspecto, a avicultura é um dos setores que mais cresceu nas últimas décadas (Almeida, 2000).

No Brasil, a produção de frango baseia-se principalmente em criações comerciais, com animais submetidos a manejos intensos e padronizados, normalmente com altos índices de produção. Porém, ainda presente na cultura do meio rural, o frango criado de áreas abertas (frango caipira) também tem boa participação no mercado interno. Uma das principais diferenças do frango caipira é a alimentação, na maioria dos casos, sem a utilização de promotores de crescimento. Em alguns casos as aves se alimentam apenas de grãos de milho e daquilo que obtém no ambiente.

Em consequência dos métodos atuais de manejo em frangos de corte comerciais, voltados para altos parâmetros de produção e caracterizados por alta densidade populacional, o uso de substâncias inibidoras e promotoras de crescimento como bactericidas e bacteriostáticos na ração, tem sido amplamente aplicado no Brasil. Com a alta exigência nutricional, aliada ao modelo de produção intensivo, os animais muitas vezes tornam-se mais susceptíveis a desequilíbrios bacterianos intestinais. O desbalanço intestinal pode levar a alterações na digestão e absorção de nutrientes além de retardamento de crescimento. Na tentativa de vencer estas dificuldades, dietas com antimicrobianos provaram-se eficientes no controle de desbalanços intestinais e na promoção de crescimento (Armstrong, 1986).

Por outro lado, o uso indiscriminado e permanente de antibióticos na ração dos animais pode selecionar microrganismos resistentes (Xavier, 2006). O uso de probióticos tem sido proposto como outra alternativa para favorecer o crescimento das aves (Lyons, 1990; Fuller, 1989).

3.2 Probióticos

O termo probiótico (significando “a favor da vida”) foi utilizado pela primeira vez em 1965. Lilley e Stillwell (1965) o utilizaram para descrever substâncias secretadas por um microrganismo que estimulam o crescimento de outro. Em 1974, Parker descreveu: probióticos são organismos ou substâncias que contribuem para o ótimo balanço microbiano intestinal. Este conceito foi modificado por Fuller (1989), caracterizando os probióticos como suplementos alimentares constituídos de microrganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal.

Para fins de padronização, a Organização Mundial de Saúde e a Organização de Agricultura e Alimentos utiliza hoje o seguinte conceito: microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (Joint FAO/WHO, 2002).

Apesar da palavra probiótico ser considerada recente, a utilização de microrganismos benéficos à saúde data de milhares de anos. Bactérias e leveduras, por exemplo, estavam presentes nos primeiros alimentos fermentados (Fuller, 1992).

3.2.1 Características dos probióticos

Algumas características são importantes para seleção de um microrganismo como probiótico:

- a) não ser patogênico
- b) ter boa capacidade de adesão ou ação efetiva inibindo bactérias patogênicas (mantendo os efeitos por longo período);
- c) ser capaz de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal (acidez gástrica e sais biliares) e nele sobreviver;
- d) modulação da atividade imunológica;
- e) Ser produzido em ampla escala; produzir efeito benéfico ao hospedeiro (redução da carga de patógenos por competição em sítios de adesão ou pela produção de substâncias inibidoras de crescimento; e contribuição nutricional);
- f) permanecer estável e viável durante a estocagem;
- g) não prejudicar a qualidade do alimento utilizado como carreador, do mesmo modo que o alimento ou seu processamento não deve prejudicar o inócuo bacteriano (Fuller, 1989; Chaves et al., 1999; Joint FAO/WHO, 2003)

A FAO/WHO recomenda que os microrganismos utilizados como probióticos, por apresentarem relação espécie-específica com os hospedeiro, devem ser identificados genotípica e fenotipicamente, além de ter seus efeitos sobre a saúde investigados (Anexo 1) (Joint FAO/WHO, 2002).

3.2.2 Mecanismos de ação

Existem diferentes formas de suprimir a presença de microrganismos indesejáveis utilizando-se probióticos. A exclusão competitiva, a modulação da atividade imunológica, a inibição pela ação de toxinas, a ação diminuindo a produção de aminas tóxicas, aumentando a disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção, a economia de energia e aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas e a produção de metabólitos bactericidas, como o ácido láctico, são as mais relatadas (Souza et al., 2007).

Considerando-se o trato gastrointestinal como alvo, para que um microrganismo possa exercer sua ação probiótica é necessário que o mesmo seja fornecido em uma quantidade adequada, para que, após perdas diversas no trânsito intestinal, o nível populacional permaneça adequado. Alguns microbiologistas recomendam pelo menos 10^7 UFC/grama de conteúdo intestinal (Nicoli, 1995; Guillot, 2001).

Bactérias comensais no intestino estão em contato direto com as células intestinais associadas ao sistema imune. Interações entre as células do hospedeiro e a bactéria ou seus componentes estruturais podem levar à modulação de respostas imunes mediadas por células B ou T, tanto local quanto sistemicamente (Haghighi et al., 2006).

Os probióticos também atuam de forma a proteger a mucosa intestinal. A adesão destes microrganismos aos enterócitos protege os vilos e as superfícies absorptivas contra toxinas produzidas por microrganismos indesejáveis, beneficiando a regeneração da mucosa lesada. O resultado final está relacionado à manutenção da superfície de absorção de nutrientes, refletindo em melhor conversão alimentar e ganho de peso das aves (Dobrogosz et al, 1991).

3.2.3 Probióticos e avicultura

A pressão exercida para diminuir o uso de promotores de crescimento contendo antimicrobianos tem intensificado a procura e o uso de outras possibilidades de proteção dos plantéis avícolas. Exemplos de proibição do uso de antibióticos podem ser encontrados no Brasil: em 1992, a Portaria n. 159, do Ministério da Agricultura vedou o uso de antimicrobianos como aditivos sistêmicos, promotores de crescimento ou conservantes como tetracilinas, penicilinas, cloranfenicol e sulfonamidas; o Ofício circular 19/98 de 16/11/98 do Ministério da Agricultura, suspendeu o uso de Avoparcina e a Portaria 448 de 10/09/98 proibiu a fabricação, importação e uso de Cloranfenicol, Furazolidona e Nitrofurazona (Jim et al., 1998; Silva, 2000; Alberton, 2004).

Considerando-se essa pressão, uma das possibilidades de proteção dos plantéis avícolas é o uso de probióticos, também utilizados em outros setores da pecuária. Os objetivos principais estão relacionados à manutenção de cargas bacterianas patogênicas baixas nos locais de criação, integridade dos sistemas digestivo e respiratório e saúde geral dos animais envolvidos nos processos de produção, visando assim, a manutenção ou a melhora dos índices zotécnicos (Jim et al., 1998; Silva, 2000).

Os fundamentos da administração de probióticos amparam-se ainda na prevenção de eventos estressantes, presentes em todas as etapas da criação das aves. Durante os períodos de baixa resistência, bactérias indesejáveis podem se proliferar e favorecer o desbalanço da microbiota intestinal. Entre os fatores de estresse observados na produção de aves pode-se destacar a eclosão, o transporte, a vacinação, a debicagem, a superlotação, as temperaturas extremas, o pico de postura, o início de postura, a muda forçada, a pesagem, manejos de luz e qualquer outro manejo que interfira no comportamento natural (Fox, 1988; Hoyos, 1997).

O fornecimento dos microrganismos benéficos pode ser realizado de diferentes formas. A veiculação pela água ou ração são os métodos mais comuns, porém a pulverização sobre as aves, a inoculação em ovos embrionados, via endoesofágica, via cloaca, e a reutilização de cama também podem ser utilizadas (Guillot, 2001; Andreatti Filho & Crocci, 2002).

O contato de aves recém nascidas com microrganismos probióticos pode ser extremamente desejável. Maiorka et al. (2001) consideram a baixa diversidade da microbiota intestinal como um fator limitante para digestão, possibilitando ainda a colonização por patógenos entéricos.

Os frangos de corte provenientes de incubadoras comerciais têm pouco contato com microrganismos até o seu alojamento, e ficam susceptíveis a todo tipo de contaminação microbiana, geralmente patogênica. De acordo com Mead (2000), nas condições citadas acima, uma população bacteriana similar à do adulto está presente em duas semanas no intestino delgado e em cerca de 30 dias no ceco. Foi atestado ainda que o fornecimento imediato de microrganismos vivos após o nascimento favorece a formação de uma microbiota saudável e equilibrada (Jin et al., 1997).

Os microrganismos que mais são utilizados como probióticos são principalmente, bactérias Gram positivo, como *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. e leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, nem todos são aprovados oficialmente. Na União Européia, apenas isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus* spp. e *Bacillus* spp. são permitidos. Dentre esses microrganismos alguns apresentam, normalmente, quantidades elevadas na microbiota do TGI de aves, como os *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp., atingindo populações de 10^8 e 10^6 UFC/grama de conteúdo intestinal, respectivamente (Guillot, 2001, Nicolli et al., 2003). A Tabela 1 relaciona as principais bactérias probióticas utilizadas na produção animal.

Há relatos ainda de que a administração de probióticos para pintos recém-eclodidos reduz o índice de mortalidade e, para aves jovens, melhora o seu desempenho. O uso de microrganismos benéficos pode ser vantajoso também em casos de diminuição das defesas orgânicas, normalizando a microbiota intestinal e aumentando a resistência dos animais ao estresse (Silva, 2000, Nicolli et al., 2003).

Tabela 1. Principais bactérias probióticas.

Microrganismos	Gênero	Espécies
Bactérias lácticas não esporuladas (Gram positivas)	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosum</i> , <i>L. GG.</i> , <i>L. delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L.</i> <i>brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. adolescents</i> , <i>B. animalis</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. Lactis</i> , <i>S. cremosis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S.</i> <i>leuconostoc</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
	Bactérias lácticas Esporuladas (Gram positivas)	<i>Sporolactobacillus</i>
Bactérias não lácticas Esporuladas (Gram positivas)	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B.</i> <i>cereus</i> (var. <i>Toyoi</i>), <i>B. licheniformis</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freundenreichii</i>
Leveduras	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> (R), <i>S. boulardii</i> (R).
Fungos	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. Oryzae</i> (R).

Caja et al., 2003.

3.3 Bactérias utilizadas no experimento

No presente estudo foram utilizadas bactérias produtoras de ácido láctico (*Enterococcus* e *Lactobacillus*) e não produtoras de ácido láctico (*Bacillus subtilis*).

As bactérias ácido-lácticas são encontradas em inúmeros ambientes na natureza. Nos animais, são também habitantes dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior. O grupo inclui tanto bastonetes quanto cocos não esporulados, dividindo-se em aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. A maior parte das bactérias desse grupo não suportam temperaturas superiores a 70°C. O metabolismo é homofermentativo, quando produz somente ácido láctico, ou heterofermentativo, se há produção de outras substâncias, como ácido acético, dióxido de carbono e etanol. Dependendo da espécie de bactéria ácido-láctica, a capacidade de fermentação pode variar, normalmente limitando-se entre 0,5% e 1,5% de ácido láctico. (Souza et al., 2007).

3.3.1 *Lactobacillus* spp.

Os lactobacilos podem ser encontrados em diferentes ambientes, com maior frequência em *habitats* ricos como vegetais, na microbiota do TGI, no trato respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais, e em diversos alimentos fermentados. (Jay, 1996; Souza et al., 2007).

As bactérias que compõem o gênero *Lactobacillus* são classificadas no mesmo grupo pela presença de características comuns (metabólicas, fisiológicas e morfológicas). Elas são bastonetes Gram-positivo, catalase negativa, imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, aerotolerantes, nutricionalmente exigentes, tolerantes à acidez, com metabolismo fermentativo, possuindo como principal produto o ácido láctico (Jay, 1996).

As espécies podem ser diferenciadas utilizando-se os seguintes procedimentos: análise molecular de seu genoma, mobilidade eletroforética de algumas enzimas, determinação dos tipos de peptidoglicanos dos componentes celulares, análises imunológicas de enzimas homólogas a lactato desidrogenase, definição de grupos antigênicos, determinação de isômeros de ácido láctico obtidos e fermentação de carboidratos. (Souza et al., 2007)

3.3.2 *Enterococcus* spp.

A distribuição dos enterococos é ampla, podendo ser encontrados no solo, em plantas, na água e em diversas espécies do reino animal, incluindo mamíferos, aves, répteis e insetos (Aarestrup et al., 2002). É sabido também que a utilização de enterococos em probióticos é comum, podendo ser aplicado a diversas espécies animais (Tournut, 1998, Netherwood, 1999, Decroos, 2004).

A utilização de *E. gallinarum* como bactéria probiótica ainda não foi testada. Estudos relacionando o uso de *E. faecalis* em frangos mostraram porém que esta bactéria possui bom potencial probiótico (Musikasang et al., 2009). Dessa forma, o estudo da variabilidade genética e de fatores que auxiliem na colonização do trato gastrointestinal por esses enterococos é importante para elucidar o verdadeiro papel desse microrganismo como probiótico.

As bactérias do gênero *Enterococcus* são classificadas como cocos Gram-positivos, podendo ser visualizados como células individuais ou arranjar-se aos pares ou em cadeias, apresentando comumente morfologia ovóide. São anaeróbios facultativos, crescem a temperaturas de 10°C a 45°C, sendo 35°C a temperatura ótima de crescimento. Crescem em meios contendo cloreto de sódio 6,5%, hidrolisam esculina na presença de 40% de sais biliares e, em sua maioria, hidrolisam a pirrolidonil- β -naftilamida (PYR). Apesar de serem catalase-negativos, podem produzir uma pseudocatalase, causando fraca efervescência no respectivo teste (Murray et al., 1990, Facklam, Carvalho & Teixeira, 2002).

As espécies do gênero *Enterococcus* podem ser identificadas por testes fenotípicos convencionais (Facklam et al., 2002). Além disto, diversos métodos moleculares para identificação de espécies já foram descritos, a maioria baseando-se em reações de PCR (Dutka-Malen et al., 1997, Titze-de-Almeida et al., 2004). Assim, as seguintes espécies de enterococos já foram descritas: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. asini*, *E. villorum*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. ratii*, *E. porcicus*, *E. pallens*, *E. gilvus*, *E. seriolicida*, *E. solitarius* (Facklam et al., 2002).

3.3.3 *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram positiva, catalase positiva, com formato de bastão, não patogênica e formadora esporos. As Colônias são largas, porém menos que as de *B. cereus*. As margens são onduladas, com forma circular e uma elevação achatada. Esporos de espécies de *Bacillus* são encontrados no solo, poeira, água e até no ar. Entretanto, o solo ainda é considerado seu principal reservatório. Pela associação com matéria proveniente de plantas, é esperado que os esporos de *Bacillus* consigam entrar no TGI dos animais pela ingestão. Algumas regiões do TGI em particular (estômago, por exemplo) formam barreiras eficientes contra bactérias vegetativas, deixando porém esporos passarem desimpedidos. O TGI, especialmente o intestino delgado, é rico em nutrientes e, apesar do baixo pH, pode alcançar a neutralidade na porção final do cólon. Para um microrganismo do solo, a germinação e crescimento no TGI é submetida a entraves, incluindo o baixo pH, a anoxia, sais biliares e concentrações de bactérias comensais extremamente altas. Mesmo com adversidades, diversas linhas de evidência sugerem que esporos de *Bacillus* se adaptaram a viver e sobreviver dentro do TGI (Nguyen et al., 2006; Nicholson, 2002).

Um estudo recente demonstrou ainda espécies de bacilos encontradas diretamente no TGI de frangos de corte (Barbosa et al., 2005). Opalinski et al (2007) relataram ainda grande melhora na conversão alimentar utilizando-se probiótico com *B. subtilis*.

3.4 Trato Gastrointestinal (TGI) de frangos (*Gallus gallus domesticus*)

O trato gastrointestinal das aves, segundo Reece (2006), é um tubo oco e fibromusculoso que se estende do bico à cloaca, com algumas estruturas acessórias, desempenhando as funções de ingestão, trituração, digestão e absorção de nutrientes essenciais aos processos metabólicos, posteriormente sendo transportados pela corrente sanguínea para todos os órgãos e tecidos, bem como a eliminação dos resíduos sólidos através de suas fezes.

Segundo Sisson (1986), a anatomia do sistema digestório das aves domésticas pode ser descrita, da região cranial para a caudal, da seguinte maneira: cavidade oral, faringe, esôfago, inglúvio, proventrículo, moela, intestinos delgado, ceco e intestino grosso, e cloaca. A ele também estão ligadas duas glândulas anexas, o fígado e o pâncreas, além da bolsa cloacal.

(Anexo 2 – ilustração)

O conhecimento das estruturas do TGI é importante para a padronização das metodologias de isolamento bacteriano e comparações histológicas.

A análise da histologia intestinal é utilizada para avaliação de parâmetros produtivos por diversos motivos. Estes estão relacionados principalmente a questões nutricionais como absorção e aproveitamento de nutrientes. O estudo da mucosa intestinal, por exemplo, é um aspecto relevante na fisiologia da digestão, pois ela é uma área de grande exposição a agentes que estão presentes no lúmen digestivo a partir do início da ingestão, digestão e absorção de nutrientes (Maiorka et al., 2000)

O intestino delgado é a porção mais longa do sistema digestório e nele podem-se distinguir três segmentos: duodeno, jejuno e íleo. O duodeno consiste na alça intestinal localizada ventralmente e do lado direito da moela, e constituída de uma porção proximal, descendente, e uma distal, ascendente, semelhante à letra “U”. Ele é facilmente distinguido das demais regiões do intestino pela posição do pâncreas, o qual se encontra situado entre as duas porções da alça duodenal (“U”), e por seu maior diâmetro. O jejuno é o segmento intestinal mais comprido, e é marcado pela presença de pregas jejunais unidas ao mesentério. O íleo é o segmento do intestino delgado que se estende após o jejuno. Tem uma longa parte ascendente e uma curta parte descendente, que se continua até o intestino grosso (Boleli et al., 2002).

Os órgãos tubulares do sistema digestório das aves seguem um modelo estrutural básico, constituído por quatro túnicas concêntricas, com características histológicas e funcionais distintas. Tais estruturas são túnicas denominadas, da luz para a periferia do órgão, de mucosa (onde são encontrados os vilos), submucosa, muscular e serosa. Banks (1992) relatou que entre os pontos de inserção das vilosidades na mucosa observam-se orifícios onde desembocam glândulas tubulares simples (glândulas/criptas intestinais ou de Lieberkühn).

Os vilos intestinais proporcionam um aumento na superfície interna do órgão, ou seja, na área de digestão e absorção intestinal. Na presença de nutrientes a capacidade absorptiva do segmento será diretamente proporcional ao tamanho dos vilos (Macari, 1999). Sendo assim, aves que possuem vilosidades maiores terão uma melhor absorção de nutrientes. (Cunningham, 2004).

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO DE LINHAGENS E CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS OBTIDAS DE FRANGO CAIPIRA: *ENTEROCOCCUS GALLINARUM*, *E. FAECALIS*, *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *BACILLUS SUBTILIS*

1 RESUMO

A necessidade de encontrar alternativas para proteger a saúde dos animais nos diferentes sistemas de produção está levando a indústria e os centros de pesquisa a estudar novas estratégias a serem utilizadas em substituição dos atuais promotores de crescimento. Bactérias com potencial probiótico são uma das possibilidades e têm sido testadas. Os critérios para seleção de cepas incluem, dentre outras, características como a habilidade de resistir às condições encontradas no TGI (baixo pH e sais biliares) e de agir através do antagonismo. Considerando que pouco se conhece sobre a perfeita combinação destes para elaboração de um probiótico, o presente estudo teve como objetivo testar cepas promissoras de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus gallinarum* e *E. faecalis*, aplicando-se metodologias de isolamento seletivo, identificação molecular e caracterização probiótica. Os resultados mostraram que as metodologias de isolamento seletivo e identificação molecular foram eficientes para seleção das diferentes espécies de bactérias propostas. Os testes de caracterização probiótica antagonismo, resistência ao suco gástrico artificial e inibição por sais biliares, demonstraram que a espécie *Bacillus subtilis*, na forma vegetativa, tem baixa resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares. A cepa de *Lactobacillus acidophilus*, por outro lado, apresentou bons resultados nos testes de caracterização probiótica, com alta resistência ao suco gástrico artificial e baixa taxa de inibição por sais biliares. No teste *in vitro*, foi ainda a única cepa com resultado positivo para ação antagônica contra *Salmonella enteritidis*. As cepas de enterococos demonstraram que diferentes espécies, genogrupos e diferentes locais de isolamento podem influenciar na caracterização probiótica das bactérias. Todos isolados de enterococos mostraram de baixa a moderada inibição por sais biliares, reforçando a proposição de que *E. faecalis* e *E. gallinarum* podem ser alternativas viáveis ao normalmente utilizado *E. faecium*.

2 INTRODUÇÃO

Os probióticos são alimentos ou preparados contendo organismos vivos, tradicionalmente ligados à saúde humana ou ao uso animal. Quando ingeridos em quantidade suficiente, há evidência que eles possuem um importante papel no controle da microbiota intestinal do hospedeiro, assim como na modulação de respostas imunes do mesmo (Fuller, 1997).

O aumento na regulação, aliada à proibição do uso de muitas drogas antimicrobianas na produção comercial de frangos de corte, tem ressaltado a necessidade de novas tecnologias e abordagens estratégicas para sua substituição. Os probióticos são uma alternativa promissora para a avicultura, da-se, por exemplo, o aparecimento de resíduos de antibióticos na carne das carcaças de frangos comercializados (Kalavathy et al., 2003).

Os critérios para seleção de cepas probióticas incluem características funcionais como a habilidade de resistir às condições do ambiente, encontradas no trato digestivo (baixo pH e sais biliares), agirem através do antagonismo e exclusão competitiva com outros patógenos, pela secreção de substâncias antimicrobianas ou competição por nutrientes e sítios de adesão (Servin, 2004).

Os probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não definidas. *Enterococcus*, Bacteróides, *Eubacterium* e especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes em misturas de culturas definidas. Esporos de *Bacillus subtilis* também vêm sendo utilizados para bacterioterapia e bacterioprophylaxia tanto para animais como para humanos (Hoa et al., 2000; Loddi, 2002). Quando as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas, algumas das suas propriedades são perdidas. Por outro lado, não se conhece ainda a composição total e adequada combinação entre as que melhor estimularam as propriedades probióticas “in vivo” (Loddi, 2002). Na União Européia, apenas isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus* spp. e *Bacillus* spp. são permitidos. Dentre esses microrganismos, alguns apresentam quantidades elevadas na microbiota natural do TGI de aves, como os *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. (Guillot, 2001).

Considerando que nem todos os microrganismos são aprovados oficialmente e que pouco se conhece sobre a adequada combinação destes para elaboração de um probiótico, o presente estudo teve como objetivo testar cepas promissoras de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*

acidophilus, *Enterococcus gallinarum* e *E. faecalis*, aplicando-se metodologias de isolamento e analisando-se principalmente as características de colonização.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foram coletadas amostras de frangos caipira para isolamento de linhagens de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus faecalis* favoráveis à utilização como probiótico. As espécies foram identificadas por testes bioquímicos, PCR ou kits. As características probióticas das bactérias isoladas foram determinadas por testes *in vitro* de antagonismo, inibição aos sais biliares e resistência ao suco gástrico artificial.

3.1 Enterococos

3.1.1 Obtenção de isolados

Os isolados de *Enterococcus gallinarum* utilizados neste experimento foram obtidos em estudo anterior (Xavier et al., 2008). Foram coletados swabs cloacais de 200 frangos caipiras de idade adulta, em 40 propriedades do Entorno do Distrito Federal, de 8 regiões diferentes (Jardim, Pad/DF, Paranoá, Sobradinho, Planaltina, Rio Preto, Taquara, São Sebastião). As amostras foram transportadas em meio específico (BBL transport medium, Difco) em recipiente resfriado e a semeadura inicial realizada em meio seletivo (*Enterococcosel broth*, Difco), favorecendo o isolamento de enterococos. Após a inoculação neste meio seletivo as amostras foram submetidas à incubação por aproximadamente 18 horas a 35-37°C. Se, após este período, não houvesse crescimento, as amostras eram incubadas por mais 24 horas. O enegrecimento do meio caracterizou o resultado positivo com crescimento bacteriano. Para todas as análises controles negativos e positivos foram utilizados.

Amostras com crescimento positivo foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5% para avaliação das colônias, realizando-se os testes de Gram e da catalase. Os isolados que se apresentaram como cocos Gram positivos e catalase negativos, foram identificados pela PCR.

Além do isolamento seletivo, 20 outros frangos caipiras foram submetidos à análise criteriosa da colonização intestinal. O papo, intestino e ceco foram avaliados quanto à presença da bactéria de interesse. O crescimento desses microrganismos foi realizado em meio favorável (*Enterococcosel broth*, Difco) e a identificação realizada por métodos fenotípicos padrão e também a PCR.

3.1.2 Reação de polimerização em cadeia – PCR multiplex

Estudos mostram que a técnica da reação da polimerização em cadeia (PCR) é uma forma de identificação eficiente para espécies de enterococos e genes de resistência (Dutka-Malen et al, 1997, Titze-de-Almeida et al., 2004). Segundo Titze-de-Almeida et al. (2004), é possível ainda, a identificação das espécies e genes de resistência através da utilização de colônias de enterococos, desde que sejam alteradas as concentrações dos primers.

A reação de polimerização em cadeia - PCR multiplex foi conduzida com *primers* de oligonucleotídeos para identificação dos genes *ddl*_{*Enterococcus faecalis*}, *ddl*_{*E. faecium*}, *vanC1*, *vanC2/3* (18,0 pmol), *vanA* (3,0 pmol) e *vanB* (1,5 pmol) (Tabela 2). Foram adicionadas 10 colônias de enterococos à mistura de PCR contendo os primers e os seguintes reagentes: tampão de *Taq* 1X; 3mM de $MgCl_2$; 0,25mM de cada dNTP; e 2U de *Taq* DNA polimerase. A amplificação do PCR foi realizada em termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C/5min, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C/1min, anelamento a 52°C/1 min e extensão a 72°C/2 min), e uma extensão final a 72°C/5min. (Titze-de-Almeida et al., 2004). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, e fotografados sob luz ultra-violeta.

Tabela 2. Oligonucleotídeos (primers) e genes alvo utilizados para reação de PCR para enterococos.

Gene amplificado	Sequence (5' - 3') ^a	Tamanho do amplicon pares de base (bp)	Referência
<i>vanA</i>	F: GGGAAAACGACAATTGC R: GTACAATGCGGCCGTTA	732 ^c	Dutka-Malen et al., 1995
<i>vanB</i>	F: ACCTACCCTGTCTTTGTGAA R: AATGTCTGCTGGAACGATA	300 ^c	Zanella et al., 2003
<i>vanC-1</i>	F: GGTATCAAGGAAACCTC R: CTCCGCCATCATAGCT	822 ^c	Dutka-Malen et al., 1995
<i>vanC-2</i> , <i>vanC-3</i>	F: CTCCTACGATTCTCTTG R: CGAGCAAGACCTTTAAG	439 ^c	Dutka-Malen et al., 1995
<i>ddlE. faecalis</i>	F: ATCAAGTACAGTTAGTCT R: ACGATTCAAAGCTAACTG	941 ^c	Dutka-Malen et al., 1995
<i>ddlE. faecium</i>	F: TAGAGACATTGAATATGCC R: TCGAATGTGCTACAATC	550 ^c	Dutka-Malen et al., 1995

^aF, sense primer; R, antisense primer.

^cTamanho do gene amplificado para verificação de espécie e resistência à vancomicina em enterococos.

3.1.3 Eletroforese em gel de campo pulsado - PFGE

As amostras de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecium* e *E. faecalis* passaram por mais um critério de seleção. Aquelas que não apresentaram os genes de resistência à vancomicina *vanA* ou *vanB* e apresentaram características favoráveis de colonização, foram ainda submetidas à eletroforese em gel de campo pulsado para avaliação da variabilidade genética.

A tipagem de isolados microbianos é essencial para estabelecer a forma com que se espalham nas comunidades, mas também é importante para verificar mudanças evolucionárias que levem ao crescimento das “vantagens seletivas” que produzem “genotipos de sucesso” (Van Belkum, 1999)

A análise do DNA cromossomal baseia-se no princípio que existem sítios de restrição localizados na molécula de DNA. Enzimas de restrição reconhecem estes sítios e “clivam” o DNA em fragmentos. O número de fragmentos varia de um isolado para o outro. Na técnica de PFGE, o DNA cromossomal foi extraído e fixado em agarose. Para dissolução da parede celular bacteriana, detergentes apropriados, enzimas líticas e proteinase K foram utilizados. Depois de extraído, o DNA foi digerido com enzimas de restrição (*Sma* I), separado pela eletroforese em gel

de campo pulsado (Agarose 1%, Tempo de corrida 23 horas, “switch time” 5 - 30 segundos, 6V/cm; 14° C, separação dos fragmentos em Kb <50 - 350), corado em Brometo de Etídio e visualizado sob luz ultra violeta. (Tenover et al., 1995, Titze-de-Almeida et al., 2004).

Os isolados foram identificados por inspeção visual e classificados de acordo com o critério internacionalmente aceito (Tenover et al., 1995).

3.2 *Lactobacillus acidophilus*

3.2.1 Obtenção de isolados

Vinte frangos caipiras foram abatidos por deslocamento cervical e as amostras do trato gastrointestinal coletadas imediatamente. Esse procedimento foi determinante para identificação das principais regiões de isolamento das bactérias alvo.

Foram coletadas amostras de aproximadamente 2cm de comprimento para cada segmento estudado: papo, duodeno, íleo, ceco, porção inicial do IG, porção final do IG. Cada amostra foi incubada, sem o conteúdo intestinal, em meio BHI (meio Infusão Cérebro Coração) por 18 horas. Antes de colocá-las na estufa, cada tubo contendo o meio e o segmento analisado foi submetido ao vortex por 30 segundos.

Após o crescimento, cada amostra foi semeada no meio Lactobacilli MRS Agar (Difco®), meio seletivo para este gênero. Os meios foram incubados a 37°C por 36 horas em microaerofilia.

As placas com crescimento positivo foram submetidas aos testes da catalase e de Gram. Os isolados caracterizados como bacilos Gram positivos, catalase negativos foram identificados posteriormente pela reação da polimerase em cadeia (PCR).

Após verificação do trecho do trato gastrointestinal mais favorável para isolamento de *Lactobacillus acidophilus*, este foi adotado como padrão para o isolamento das diferentes linhagens e para identificar as mais favoráveis à composição do probiótico.

3.2.2 Reação de polimerização em cadeia - PCR

Para este procedimento de identificação foram utilizados primers espécie-específicos baseados no gene 16S rRNA. Foram utilizados os seguintes primers: Aci16SI 5' – AGCTGAACCAACAGATTAC - 3', e Aci16SII 5' – ACTACCAGGGTATCTAATCC – 3', com temperatura de anelamento de 62°C e concentração de MgCl₂ de 1,5mM. A reação (25µl) continha Tampão 1x, 200µM de cada deoxynuclease triphosfato, 10pmol de cada primer, 50ng de DNA bacteriano (extraído de culturas puras), 1,75U de *Taq* DNA polymerase. O ciclo de amplificação foi: 92°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 30s. Um único ciclo de 72°C por 1 minuto concluiu o programa. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV (Walter et al., 2000).

3.3 *Bacillus subtilis*

3.3.1 Preparo de amostras fecais, isolamento bacteriano e condições de crescimento

Vinte amostras de material fecal fresco foram coletadas de frangos caipiras saudáveis de fazendas no Distrito Federal. Aliquotas fecais foram inicialmente diluídas 1:1 em tampão água-peptona (Oxoid) e ressuspendidas pela agitação vigorosa em vórtex até que fosse distribuída uniformemente. Isolados formadores de esporos foram selecionados pelo aquecimento e/ou tratamento por etanol. Para o tratamento por calor, a suspensão foi diluída novamente 1:10 em tampão água-peptona e incubada a 65°C por 20 a 45 minutos. Para o tratamento por etanol, a suspensão original foi diluída 1:1 em etanol (concentração final, 50% vol/vol) e incubada por uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram plaqueadas alíquotas de 0,1ml diluídas serialmente 10 vezes em tampão água-peptona (até 10⁻⁵), todas incubadas em aerobiose em placas de ágar nutriente (Difco®) que suporta germinação. Foi realizada incubação por 24 a 48 horas a 37°C. Colônias com diferentes morfologias foram escolhidas aleatoriamente e purificadas pela semeadura em novas placas contendo o mesmo meio. Os isolados de *Bacillus* foram incubados por crescimento aeróbio a 37°C. Foi utilizada amostra controle de *B. subtilis* em todas as etapas descritas.

A atividade da catalase dos isolados bacterianos foi detectada pela ressuspensão de uma colônia em uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio (Sigma). As características de hemólise foram determinadas em placas de ágar sangue de carneiro 5%, semeado com colônias frescas. As leituras foram feitas após incubação a 37°C por 24 horas.

A identificação da espécie *Bacillus subtilis* foi realizada a partir de testes bioquímicos próprios (Quinn et al, 1994).

3.4 Caracterização Probiótica

3.4.1 Resistência ao suco gástrico artificial

Culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *E. gallinarum*, *E. faecalis* e *Bacillus subtilis*, em fase estacionária, foram diluídas 10x em suco gástrico artificial (NaCl_2 g l⁻¹, pepsina 3.2 g l⁻¹, pH ajustado para 2.5 com HCl concentrado) e incubadas a 37°C por 3h. A viabilidade das células foi avaliada plaqueando-se 0,1ml de alíquotas do controle (CT), diluídas em série (em salina 0,85%) e das células tratadas com o suco gástrico (AGJ), em ágar MRS. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram enumeradas após incubação a 37°C por 24h e a porcentagem de inibição de crescimento calculada pela fórmula $(1 - \log \text{UFC}_{\text{AGJ}} / \log \text{UFC}_{\text{CT}}) \times 100$ (Neumann et al., 1991).

3.4.2 Tolerância aos sais biliares

A tolerância aos sais biliares foi avaliada de acordo com Walker e Gilliland (1993) adaptado para microplacas. Inicialmente, os isolados de *Lactobacillus acidophilus*, *E. gallinarum*, *E. faecalis* e *Bacillus subtilis* foram cultivados a uma OD_{600nm} de 0.6 e 1% inoculados em caldo MRS contendo (BS – com sais biliares) ou não (CT – controle sem sais biliares) 0,3% de oxgall (Oxoid Co.) em uma microplaca. Então a OD_{600nm} foi determinada em intervalos de 15 minutos durante 12h de incubação a 37°C em uma Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 (Molecular Devices, CA, USA). A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada $(1 - \text{A}_{\text{BS}} / \text{A}_{\text{CT}}) \times 100$ após 6h de incubação.

3.4.3 Antagonismo

Foi realizada a determinação da atividade antagonista pelo ensaio *in vitro*, verificando-se a ação de ácidos orgânicos e a produção de bacteriocinas pelos isolados, frente a um desafio com *Salmonella enteritidis*.

As bactérias isoladas foram cultivadas em meios específicos (Lactobacilli MRS para lactobacilos, BHI para enterococos e bacilos) por 24 horas a 37°C. Após o crescimento, uma alíquota (5 µl) da cultura foi semeada no *Ágar* MRS (Difco) e BHI (Difco). Após incubação a 37°C por 48h nas condições de anaerobiose (*Lactobacillus*) e aerobiose (demais), as células foram mortas pela exposição ao clorofórmio durante 20 minutos. Foi permitido que o clorofórmio residual evaporasse e, posteriormente, foi distribuído sobre a placa 3,5ml de BHI semi-ágar (0,7%), previamente inoculado com 0,2ml de cultura de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis, e de cada um dos isolados deste experimento, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus subtilis*. Após 24 horas de incubação a 37°C sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, dependendo da cepa indicadora, as placas foram avaliadas para a presença de zona de inibição de crescimento (Souza et al., 2007).

3.5 Análise estatística

Os resultados da resistência das bactérias ao suco gástrico artificial e inibição de crescimento delas por sais biliares foram submetidos à análise estatística. O procedimento GLM (análise de variância) do programa SAS[®] foi utilizado. A análise de variância foi realizada para determinar o efeito da presença ou ausência de sais biliares, bem como o tipo de bactéria, sobre o percentual de inibição. A comparação dos diferentes tratamentos por inibição dos sais biliares foi feita usando o teste de Duncan (P<0.05). Para avaliação da resistência ao suco gástrico artificial utilizou-se o teste de χ^2 (efeito do uso do suco gástrico (ou não) sobre o número de unidades formadoras de colônias).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indivíduos, coletas de amostras e identificação das cepas

As metodologias de identificação permitiram selecionar linhagens das espécies *E. gallinarum* (n=2), *E. faecalis* (n=2), *Lactobacillus acidophilus* (n=1) e *Bacillus subtilis* (n=1).

4.1.1 *E. gallinarum* e *E. faecalis*

O ensaio de isolamento seletivo para enterococos a partir das amostras de swab cloacal e a PCR possibilitaram a identificação de 26 isolados de *E. gallinarum* e um isolado de *E. faecalis*. A Figura 1 representa o resultado de um PCR multiplex realizado com colônias sugestivas de enterococos.

Isolados de *Enterococcus gallinarum*, espécie mais prevalente nesse isolamento, foram submetidos ao teste de genotipagem (Xavier et al., 2006). Para o presente estudo foram selecionados dois isolados desta espécie, provenientes de genogrupos diferentes (mais prevalente – H2; e menos prevalente – I) (Figura 2). Isto implica em diferentes habilidades e capacidades de colonizar diferentes indivíduos e de se espalhar em uma determinada população. Foram comparados parâmetros de resistência ao suco gástrico e inibição por sais biliares (testes de caracterização probiótica) para cada uma.

As duas cepas de *E. faecalis* foram escolhidas após isolamento seletivo dos vinte animais dissecados. Foi selecionada uma cepa proveniente do ceco e uma do papo. As duas cepas foram classificadas em genogrupos diferentes. Os mesmos testes de caracterização probiótica foram realizados para estas cepas.

A grande maioria dos probióticos produzidos para aves hoje, contém *Enterococcus faecium* em sua composição (Netherwood et al., 1999, Carina et al., 2000, Vahjen et al., 2002, Decroos et al., 2004), porém, é sabido que em aves há uma prevalência similar ou maior de *E. faecalis* e *E. gallinarum* (Günter Klein, 2003, Xavier et al, 2006). Essa prevalência foi confirmada no presente estudo, reafirmando a importância do teste do potencial probiótico destas cepas no cenário da avicultura.



Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de isolados de enterococos do presente estudo: L, Ladder 100bp; 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 15, *E. gallinarum* (822bp); 3, amostra negativa; 4, *E. casseliflavus* (439bp); 14, *E. faecalis* (941bp); 16, controle negativo.

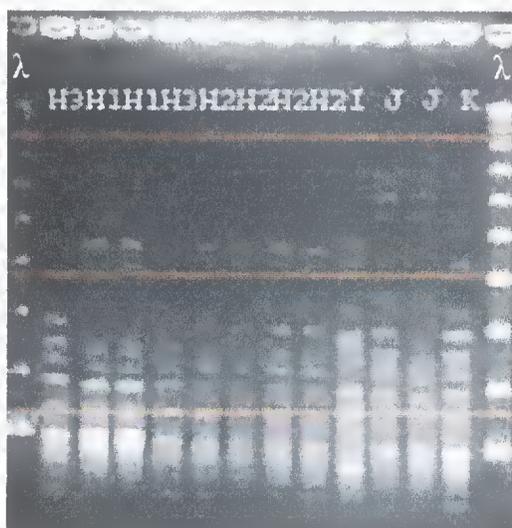


Figura 2. Eletroforese em gel de cabo pulsado de amostras de *Enterococcus gallinarum* obtidas de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal. Os perfis eletroforéticos são designados com as letras maiúsculas (H, I, J, e K) e os subtipos descritos com a mesma letra maiúscula seguida do número arábico. Os padrões de peso molecular λ – Lambda ladder 48.5Kb estão indicados à esquerda e à direita do gel.

4.1.2 *Lactobacillus acidophilus*

Somente uma cepa, entre 18 sugestivas, foi identificada na PCR como *Lactobacillus acidophilus*. Proveniente de um dos 20 frangos caipiras dissecados, o isolado foi obtido de crescimento do ceco.

Mota et al. (2006) em isolamento seletivo, conseguiu recuperar sete espécies diferentes lactobacilos, *L. reuteri* (31,6%), *L. acidophilus* (29,0%), *L. johnsonii* (10,5%), *L. salivarius* (10,5%), *L. vaginalis* (10,5%), *L. crispatus* (5,3%) e *Lactobacillus* spp (2,6%). Em conformidade com nosso isolamento, a espécie *L. acidophilus*, foi isolada com maior frequência do ceco das aves. Considerando-se que o atual estudo visava isolar apenas *L. acidophilus*, os demais isolados sugestivos de lactobacilos mas negativos para a espécie *L. acidophilus* não foram identificados.

4.1.3 *Bacillus subtilis*

Um único isolado foi identificado como *Bacillus subtilis*, proveniente de swab cloacal. Nenhuma das amostras obtidas a partir de trechos do trato gastrointestinal dos 20 frangos caipiras foi sugestiva de *B. subtilis*. Somente um isolado desta espécie foi utilizada para compor o probiótico.

O resultado de isolamento desta cepa confirma a baixa concentração de *Bacillus subtilis* naturalmente isolados do TGI de animais em alguns trabalhos, normalmente atribuída às condições adversas de baixo pH, ausência de oxigênio e competição com bactérias comensais. É sabido, porém, que animais podem ser colonizados por esporos de bacilos após ingestão de plantas, pois a grande maioria dos esporos estão presentes no solo (Nicholson, 2002; Barbosa et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

4.2 Caracterização probiótica in vitro

Para estes testes, foi realizada padronização da concentração de cada isolado selecionado para uma OD_{600nm} de 0,6. A partir dessa concentração os isolados foram submetidos a crescimento por 18hs nas condições específicas de cada cepa. Realizou-se contagem de células em diferentes diluições, chegando-se ao número de células por mililitro do concentrado conforme a tabela 3.

Tabela 3. Concentração de células dos diferentes isolados na OD_{600nm} de 0,6.

Isolados	Origem	Número de colônias nas diluições		UFC/mL
		10 ⁻⁴ (0,1mL)	10 ⁻⁵ (0,1mL)	
<i>E. faecalis</i> ID5	Alça duodenal	Incontáveis	944	944x10 ⁶
<i>E. faecalis</i> Papo 4	Papo	Incontáveis	962	962x10 ⁶
<i>E. gallinarum</i> F3	Swab cloacal	Incontáveis	684	684x10 ⁶
<i>E. gallinarum</i> F15	Swab cloacal	Incontáveis	486	486x10 ⁶
<i>L. acidophilus</i> Ceco	Ceco	728	-	728x10 ⁵
<i>B. subtilis</i>	Swab cloacal	139	-	139x10 ⁵

4.2.1 Teste de antagonismo *in vitro* de microrganismos isolados de frangos (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de criações extensivas (frango caipira).

O presente estudo mostrou que não houve ação antagonica entre as cepas selecionadas, confirmando que não há interferência no crescimento de uma perante outra.

As cepas de *L. acidophilus* formaram halo de inibição ao crescimento de Salmonela. O resultado confirma a atividade antagonista frente *Salmonella enteritidis*, bactéria utilizada como reveladora (Figura 3). Resultado similar foi obtido em outros trabalhos utilizando-se microrganismos produtores de ácido láctico isolados de cecos de frangos caipira de 14 dias e seis meses de idade (Mota et al., 2006; Souza et al., 2007).

Segundo Souza et al. (2007), as amostras de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram melhor desempenho de atividade antagonista *in vitro* em relação a outras bactérias ácido lácticas (outras espécies de lactobacilos e espécies de enterococos) isoladas dos frangos caipira.

Sanders (1999) e Edens (2003) classificaram a atividade antagonista de *Lactobacillus acidophilus* como indireta, em consequência de modulação imunológica, gerando equilíbrio entre as populações que compõem a microbiota intestinal. Além deste papel, bactérias desta espécie inativam enzimas presentes nas fezes, como azorredutase e nitrorredutase, reduzindo ou eliminando seu efeito carcinogênico. *In vitro*, as atividades antagonistas são explicadas principalmente por mecanismos de produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil ou bacteriocinas. Destas formas de inibição, a mais importante é a produção de ácido láctico, normalmente alterando o metabolismo de outras bactérias sensíveis (Edens, 2003; Souza et al., 2007).

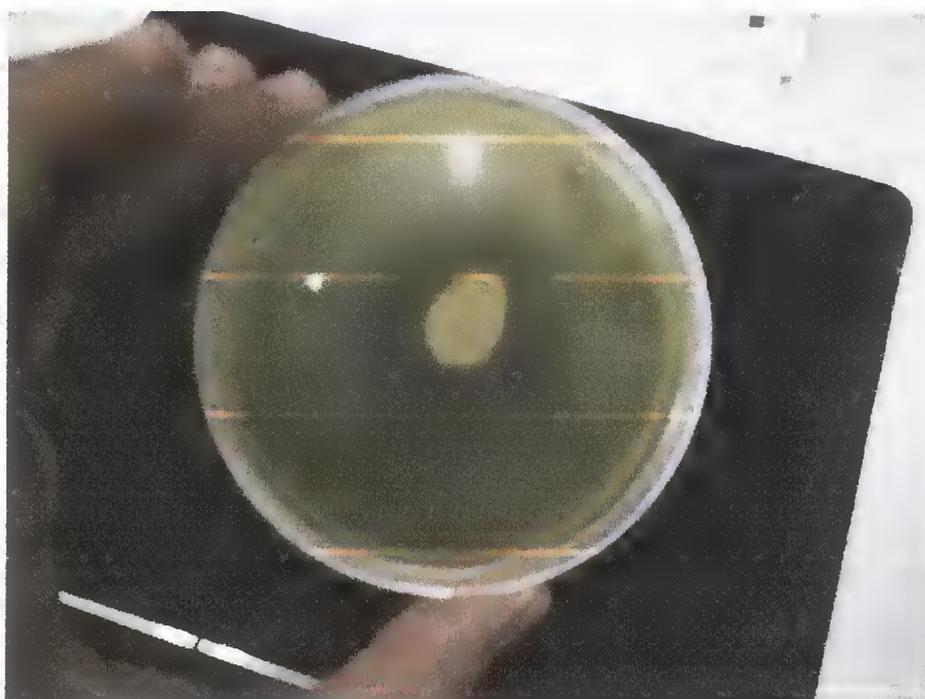


Figura 3. Halo de inibição do crescimento de *Salmonella enteritidis* por *Lactobacillus acidophilus*. Para o crescimento da estirpe de *Lactobacillus acidophilus* (isolada do ceco de frango caipira) foi o utilizado ágar Lactobacilli MRS (Difco); BHI semi-ágar (0,7%), previamente inoculado com 0,2ml de cultura de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis foi utilizado para cobrir o ágar.

4.2.2 Resistência ao suco gástrico artificial

O crescimento de todas as cepas utilizadas no probiótico foi alterado pela ação do suco gástrico artificial, com diferenças significativas (Tabela 4)

As bactérias ácido lácticas estudadas (Enterococos e Lactobacilos) apresentaram desempenho superior à bactéria não ácido láctica (*B. subtilis*). O *E. faecalis* isolado do ID foi a espécie de bactéria com maior resistência ao suco gástrico artificial, seguido pelo *E. faecalis* isolado do papo, *L. acidophilus*, *E. gallinarum* F3, *E. gallinarum* F15, e *B. subtilis*, todos com diferença significativa.

O baixo pH e o ácido clorídrico presentes no estômago são as primeiras barreiras encontradas pelos microrganismos ingeridos juntamente com os alimentos. Aqueles que

conseguem sobreviver à digestão gástrica poderão interagir com a microbiota gastrintestinal (Cerqueira, 2000). Dessa forma, tem fundamental importância a tolerância do suco gástrico pelas bactérias de um probiótico (Hoyos, 1997; Jin 1998).

O *E. faecalis* foi a bactéria com maior resistência ao suco gástrico artificial. O isolado do ID, assim como o isolado do papo, foram superiores aos demais microrganismos testados (Tabela 4). Foi confirmado que o *E. faecalis* isolado do ID possui características favoráveis à sua passagem pelo proventrículo. A alta resistência da bactéria isolada do papo pode também estar relacionada à peculiaridade fisiológica da região, onde o alimento ingerido é estocado e acidificado como resultado da atividade metabólica dos microrganismos simbióticos (Rada e Marounek, 1996).

A análise das cepas de enterococos demonstrou que diferentes espécies, genogrupos e diferentes locais de isolamento podem influenciar na caracterização probiótica das bactérias. O isolado do ID, por exemplo, obteve o melhor resultado para resistência ao suco gástrico. Entre os isolados de *E. gallinarum* estudados, o F3 (cepa do genogrupo mais prevalente H1 – Figura 2) teve desempenho superior ao F15 (cepa do genogrupo menos prevalente I – Figura 2), demonstrando que o genogrupo encontrado com maior frequência possui características de resistência ao suco gástrico mais favoráveis à sua sobrevivência no TGI das aves.

Mota et al. (2006) relatou que a utilização de *L. acidophilus* como cepa probiótica é recomendada pelas características funcionais desta bactéria como a habilidade de resistir às condições ambientais encontradas no trato digestivo (baixo pH gástrico e sais biliares). Cepas de lactobacilos normalmente apresentam baixa sensibilidade ao pH ácido. Lan et al. (2003) e Mota et al. (2006) ressaltaram essa importante característica com decréscimo na contagem de colônias menores que 10%. Em nosso estudo, o isolado de *L. acidophilus* foi mais resistente ao suco gástrico artificial que os isolados de *E. gallinarum* e *B. subtilis* porém obteve resultado bastante inferior se comparada a cepas de lactobacilos estudadas por Mota et al. (2006).

A porcentagem de inibição da cepa de *B. subtilis* comprova a alta sensibilidade desta cepa na forma vegetativa. Outros estudos confirmaram a ausência ou baixa frequência de isolamento de bacilos do TGI, normalmente atribuída às condições adversas de baixo pH, ausência de oxigênio e competição com bactérias comensais. (Nicholson, 2002; Barbosa et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Tabela 4. Resistência ao suco gástrico artificial: número de UFCs e percentual de inibição após tratamento com suco gástrico artificial (SG).

Isolados	Origem	Tratados(SG)	Não Tratados	inibição	crescimento
		UFCs	UFCs	%	%
<i>L. acidophilus</i>	Ceco	2920000 B,e	5200000 A,e	43,85	56,15
<i>B. subtilis</i>	Swab Cloacal	160 B,f	184000 A,f	99,91	0,09
<i>E. faecalis</i> papo	Papo	74800000 B,b	98640000 A,b	24,17	75,83
<i>E. faecalis</i> ID	Alça duodenal	96000000 B,a	104640000 A,a	9,18	90,82
<i>E. gallinarum</i> F15	Swab Cloacal	8400000 B,d	40800000 A,d	79,41	20,59
<i>E. gallinarum</i> F3	Swab Cloacal	31200000 B,c	75260000 A,c	58,54	41,46

* letras minúsculas diferentes referem-se a comparações dentro de uma mesma coluna ($p < 0,01$);

* letras maiúsculas diferentes relacionam comparações entre uma mesma linha ($p < 0,01$);

4.2.3 Inibição por sais biliares

Os resultados da inibição do crescimento das cepas por sais biliares variaram de acordo com a espécie avaliada.

Comparando-se o crescimento normal de todas as cepas (ausência de sais biliares) e a inibição por sais biliares, nas leituras realizadas na OD_{600nm} , foi notada diferença significativa entre as espécies em quase todas as leituras (Anexo 4). Na leitura realizada após seis horas de incubação não houve diferença significativa na taxa de crescimento entre as cepas *E. faecalis* ID (EFID) e *E. gallinarum* F3 (EGF3), na presença de sais biliares, e entre as cepas *E. faecalis* papo (EFP) e EFID, na ausência de sais. Houve diferença significativa para todos isolados estudados quando comparados os diferentes tratamentos: a presença de sais biliares foi relacionada a menores valores na leitura, indicando menor concentração de células. (Tabela 5)

Tabela 5. Percentual de inibição por sais biliares em leitura por espectrofotômetro na OD_{600nm} após seis horas de incubação.

Isolados	Origem	Leitura com sais (OD)	Leitura sem sais (OD)	Inibição (%)
BS (<i>Bacillus subtilis</i>)	Swab Cloacal	0,092 I	0,32875 E	72,02%
EFP (<i>E. faecalis</i> papo)	Papo	0,4025 C	0,4895 A	17,77%
EFID (<i>E. faecalis</i> ID)	Alça duodenal	0,37625 D	0,50225 A	25,09%
EGF3 (<i>E. gallinarum</i> F3)	Swab Cloacal	0,363 D	0,46475 B	21,90%
EGF15 (<i>E. gallinarum</i> F15)	Swab Cloacal	0,2815 F	0,45275 B	37,83%
LA (<i>L. acidophilus</i>)	Ceco	0,2385 H	0,2635 G	9,49%

* letras diferentes demonstram diferença significativa com $p < 0,01$.

Nas figuras 4 a 11 comparam-se os crescimentos, em meio normal ou com sais biliares, das bactérias estudadas.

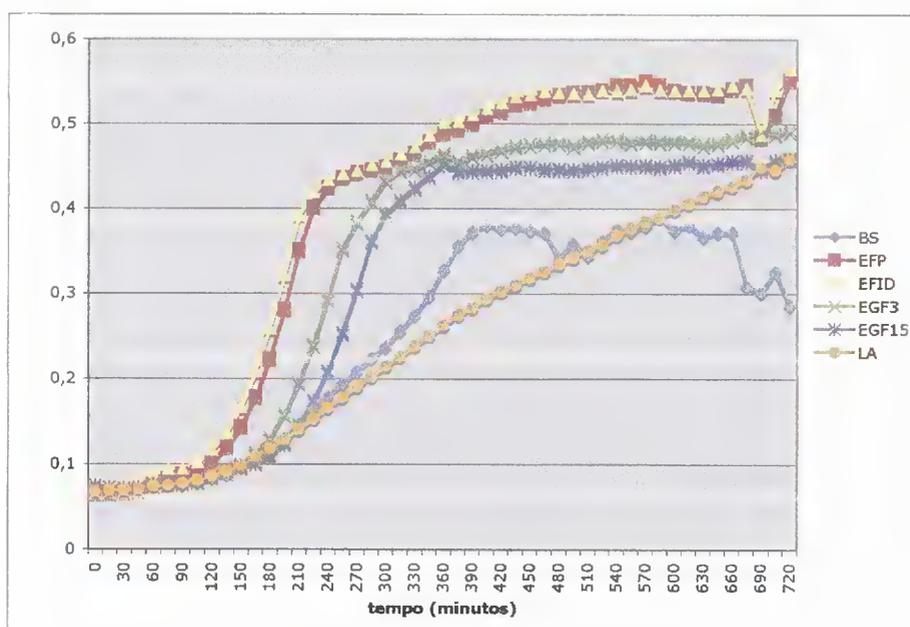


Figura 4. Concentração de bactérias incubadas na ausência de sais biliares. Isolados de BS (*Bacillus subtilis*), EFP (*E. faecalis* papo), EFID (*E. faecalis* ID), EGF3 (*E. gallinarum* F3), EGF15 (*E. gallinarum* F15) e LA (*L. acidophilus*) inoculadas em meio sem oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

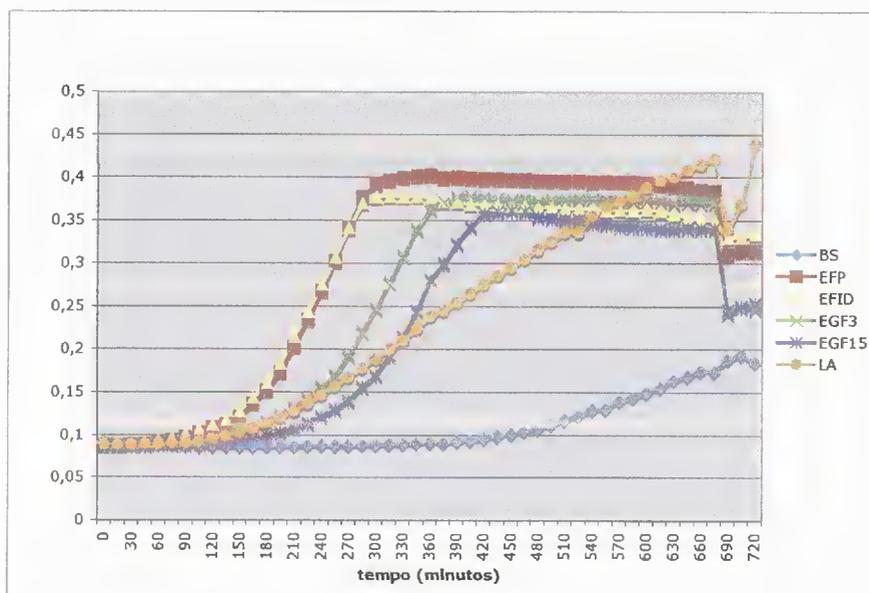


Figura 5. Concentração de bactérias incubadas na presença de sais biliares. Isolados de BS (*Bacillus subtilis*), EFP (*E. faecalis* papo), EFID (*E. faecalis* ID), EGF3 (*E. gallinarum* F3), EGF15 (*E. gallinarum* F15) e LA (*L. acidophilus*) inoculadas em meio contendo 0,3% de oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

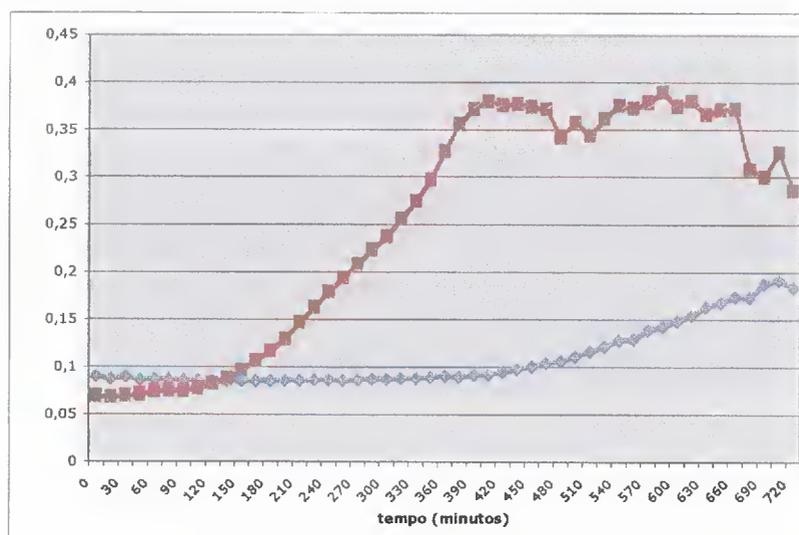


Figura 6. Concentração de *Bacillus subtilis* com e sem sais biliares. Isolados de BS (*Bacillus subtilis*) inoculadas em meio contendo (azul) ou não (vermelho) 0,3% oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

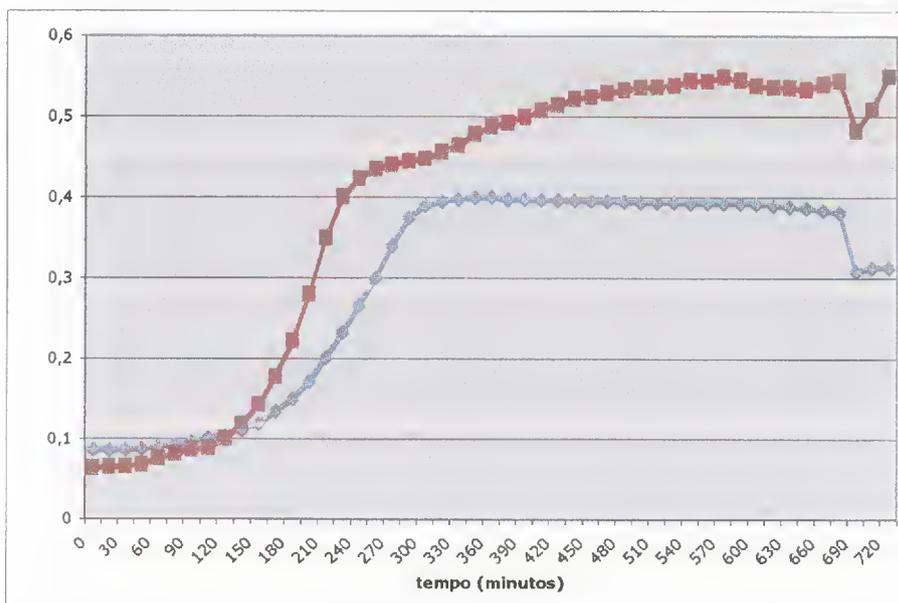


Figura 7. Concentração de *E. faecalis* (isolado do Papo) com e sem sais biliares. Isolados EFP (*E. faecalis* papo) inoculadas em meio contendo (azul) ou não (vermelho) 0,3% de oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

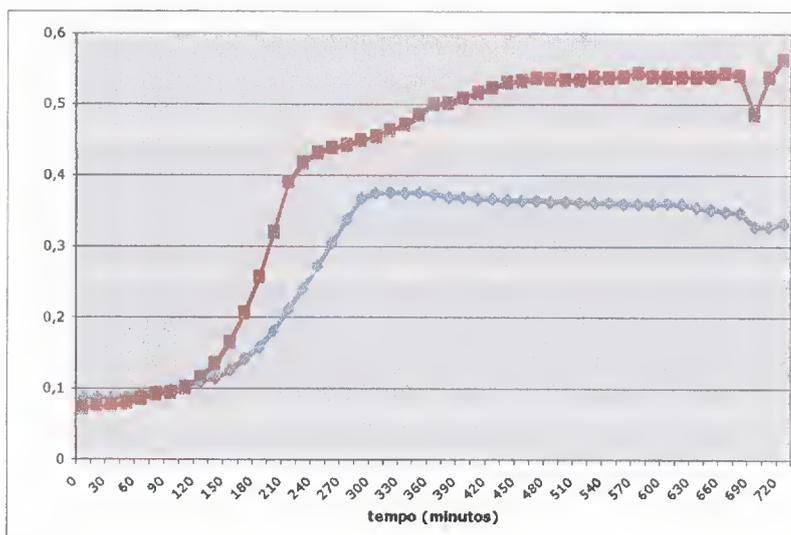


Figura 8. Concentração de *E. faecalis* isolado do ID com e sem sais biliares. Isolados de EFID (*E. faecalis* ID) inoculadas em meio contendo (azul) ou não (vermelho) 0,3% de oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

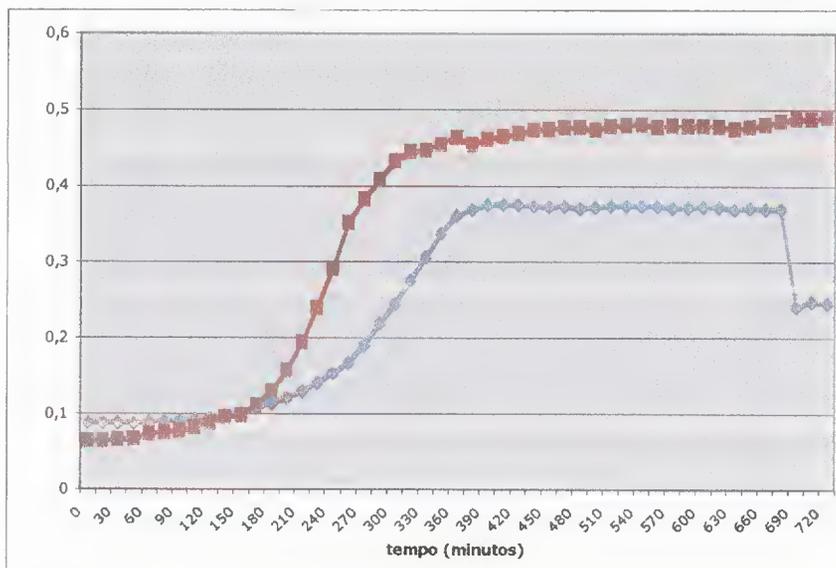


Figura 9. Concentração de *E. gallinarum* F3 (isolado de swab cloacal) com e sem sais biliares. Isolados de EGF3 (*E. gallinarum* F3) inoculadas em meio contendo (azul) ou não (vermelho) 0,3% de oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

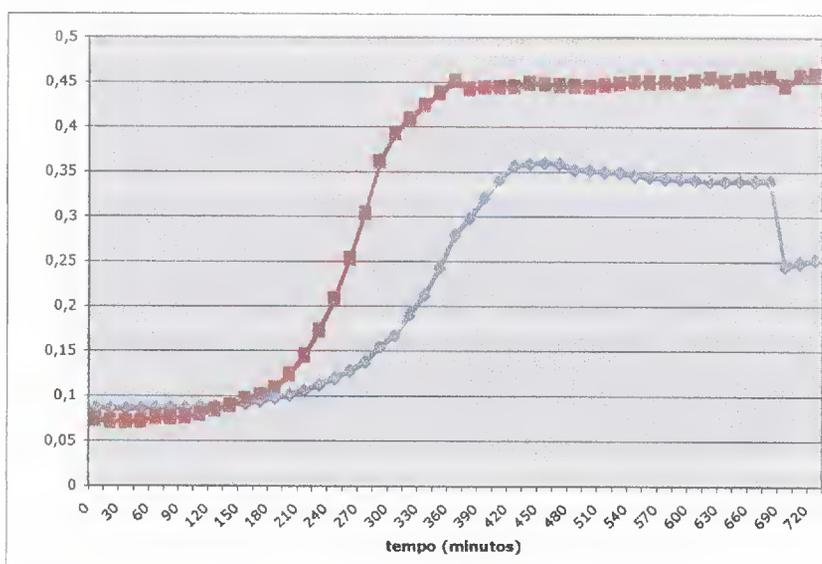


Figura 10. Concentração de *E. gallinarum* F15 (isolado de swab cloacal) com e sem sais biliares. Isolados de EGF15 (*E. gallinarum* F15) inoculados em meio contendo (azul) ou não (vermelho) 0,3% de oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

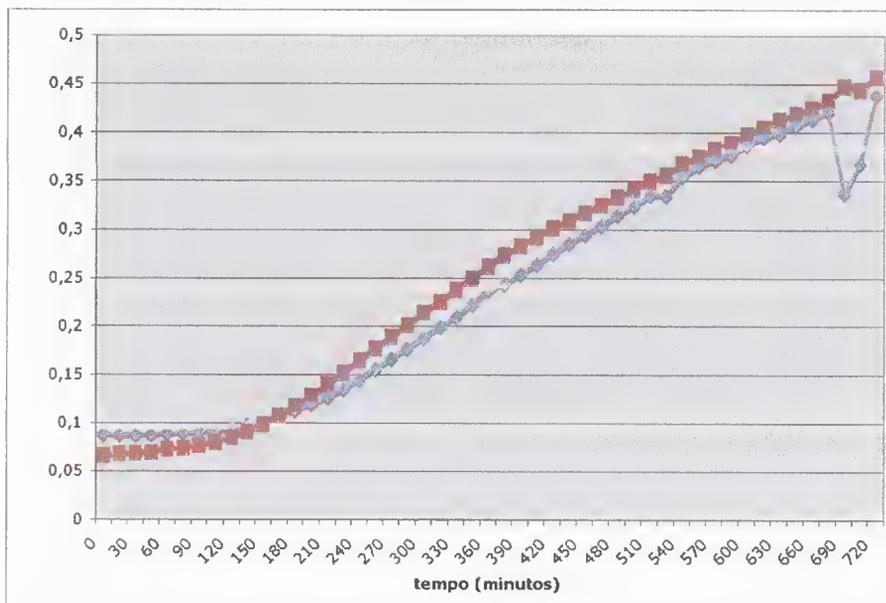


Figura 11. Concentração de *L. acidophilus* (isolado do ceco) com e sem sais biliares. Isolados de LA (*L. acidophilus*) inoculadas em meio contendo (azul) ou não (vermelho) 0,3% de oxgall (sais biliares) em microplacas. Leituras na OD_{600nm} foram realizadas em intervalos de 15 minutos durante 12 horas de incubação a 37°C. A comparação entre os tratamentos foi realizada na leitura equivalente a 360 minutos (6 horas).

A alta porcentagem de inibição de *B. subtilis* comprova a alta sensibilidade desta cepa na forma vegetativa, acrescentando a inibição por sais biliares a outras condições normalmente atribuídas (baixo pH, ausência de oxigênio e competição com bactérias comensais) à baixa taxa de recuperação de bacilos (Nicholson, 2002; Barbosa et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Dentre as bactérias analisadas, o *L. acidophilus* apresentou o menor percentual de inibição, próximo ao encontrado por Mota et al. (2006) e Lan et al. (2003) para as cepas com baixa inibição por sais biliares. Dependendo do local de isolamento e da cepa de *L. acidophilus* isolada, a porcentagem de inibição por sais biliares pode variar de 96% a 0%. Mota et al. (2006), em 38 cepas testadas, obteve somente 2 resultados superiores aos encontrados em nosso estudo.

As características de resistir ao pH gástrico e aos sais biliares são importantes para o sucesso de entrada das bactérias no trato gastrointestinal. Nesse contexto, a resistência demonstrada pelas cepas deste estudo é importante para que essas bactérias demonstrem suas características probióticas e colonizem a ave (Lan et al., 2003; Mota et al., 2006).

A análise das cepas de enterococos (EFP, EFID, EGF3 e EGF15) demonstrou que diferentes espécies, genogrupos e diferentes locais de isolamento podem influenciar na

caracterização probiótica das bactérias. O EFP, por exemplo, obteve o melhor resultado, com a maior taxa de crescimento e a menor taxa de inibição por sais biliares. Apesar dos resultados com diferença estatística, todos enterococos mostraram de baixa a moderada inibição por sais biliares.

Da mesma forma que o teste de resistência ao suco gástrico artificial, a cepa de *E. gallinarum* F3, pertencente ao genogrupo mais prevalente, obteve resultado significativamente superior à cepa *E. gallinarum* F15 (genogrupo menos prevalente).

5 CONCLUSÃO

As metodologias de isolamento seletivo, identificação molecular e genotipagem foram eficientes e permitiram a seleção das diferentes bactérias propostas. Após esta seleção, as cepas de lactobacilos, enterococos e bacilos, submetidas aos testes de caracterização probiótica (antagonismo, resistência ao suco gástrico artificial e inibição por sais biliares), demonstraram diferentes comportamentos.

O isolado de *Bacillus subtilis*, estudada na forma vegetativa, confirmou a alta sensibilidade esperada, com baixa resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares. Não houve ação antagonica contra o microrganismo revelador escolhido (*Salmonella enteritidis*).

O isolado de *Lactobacillus acidophilus*, por outro lado, apresentou bons resultados nos testes de caracterização probiótica, com alta resistência ao suco gástrico artificial e baixa taxa de inibição por sais biliares. Apresentou ainda resultado positivo para ação antagonica contra *Salmonella enteritidis*.

A análise dos isolados de enterococos (EFP, EFID, EGF3 e EGF15) demonstrou que diferentes espécies, genogrupos e diferentes locais de isolamento podem influenciar na caracterização probiótica das bactérias. O EFID obteve o melhor resultado para resistência ao suco gástrico e o EFP a maior taxa de crescimento e a menor taxa de inibição por sais biliares. Apesar dos resultados com diferença estatística, todos enterococos mostraram de baixa a moderada inibição por sais biliares.

As espécies de enterococos, *E. faecalis* e *E. gallinarum* podem ser alternativas interessantes à espécie *E. faecium*, que é normalmente utilizada.

A combinação das bactérias analisadas pode ser uma boa alternativa uma vez que explorará as principais características de cada uma delas.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA IN VIVO

1 RESUMO

Os microrganismos probióticos tem sido relacionados como responsáveis por muitos efeitos benéficos, destacando-se além da exclusão competitiva de patógenos, a melhora na digestão e absorção de nutrientes. No presente estudo foi analisada a inoculação *in ovo* e o fornecimento direto de bactérias com potencial probiótico (*Enterococcus gallinarum*, *E. faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, e *Bacillus subtilis*), sobre parâmetros produtivos (eclodibilidade, ganho de peso), microbiológicos e alterações na histologia intestinal. A inoculação *in ovo* aos 18 dias de incubação é um procedimento eficaz para colonização intestinal por bactérias probióticas, com boas taxas de recuperação nos primeiros dias de vida das aves. Os enterococos e os lactobacilos estudados são eficientes em colonizar o intestino das aves, mas sua manutenção nesse ambiente como bactérias dominantes dura poucos dias, fazendo-se necessária a administração freqüente para que os efeitos sejam mantidos. A forma vegetativa da cepa de *B. subtilis* não é viável para utilização como probiótico. Não foram notadas diferenças significativas no ganho de peso dos animais, porém, o uso de bactérias probióticas, principalmente a mistura das bactérias estudadas (mix probiótico) demonstrou características interessantes à produção avícola, aumentando a altura das vilosidades do intestino delgado e a profundidade das criptas. Foi favorável também ao aumento da espessura da camada de queratina do papo e da espessura da mucosa do intestino grosso. Todas essas características estão intimamente relacionadas à melhor absorção de nutrientes.

2 INTRODUÇÃO

O importante papel da microflora gastrointestinal na manutenção da condição sanitária e de saúde de animais e humanos tem sido cada vez mais reconhecido (Savage, 1977; Ewing e Cole, 1994; Berg, 1996). Na pesquisa avícola, estudos envolvendo saúde intestinal, relacionados ao conceito de exclusão competitiva, também conhecida como resistência à colonização ou interferência bacteriana, têm sido realizados há mais de 30 anos (Nurmi e Rantala, 1973).

De acordo com esse conceito, o controle, eliminação, ou ambos, de patógenos intestinais como *Salmonella* spp. é possível pela administração oral de microflora intestinal de adultos “saudáveis” ou culturas de tal material para frangos jovens criados na ausência da galinha. Entretanto, tem sido difícil identificar e isolar os componentes responsáveis por uma efetiva função de exclusão competitiva em microambientes variados dentro do trato gastrointestinal. Por essa razão, produtos comerciais mais eficientes que os antibióticos promotores de crescimento têm sido cada vez mais demandados.

Apesar da maioria dos probióticos possuir como alvo patógenos intestinais e contribuir significativamente para a segurança dos produtos de origem animal, nota-se ainda grande necessidade de sustentar o alto desempenho acompanhado de baixos custos de produção, especialmente após a proibição europeia do uso de antibióticos promotores de crescimento nas rações dos animais e da contínua pressão para sua remoção no mundo todo.

Na alimentação de frangos comerciais, espécies de probióticos pertencentes a diferentes grupos como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, *Candida*, e *Saccharomyces* tem obtido efeitos benéficos no desempenho (Tortuero, 1973; Owings et al., 1990; Jin et al., 1998; Zulkifli et al., 2000; Simon et al., 2001; Kalavathy et al., 2003; Kabir et al., 2004; Gil De Los Santos et al., 2005), na modulação da microflora intestinal e inibição de patógenos (Rada and Rychly, 1995; Line et al., 1998; Pascual et al., 1999) e na imunomodulação (Zulkifli et al., 2000; Dalloul et al., 2003; Kabir et al., 2004; Koenen et al., 2004).

Os microrganismos probióticos têm sido relacionados como responsáveis por muitos efeitos benéficos, destacando-se além da exclusão competitiva de patógenos, a melhora na

digestão e absorção de nutrientes (Sissons, 1989; Morishita et al., 1997; Scheinbach, 1998; Thomke, 1998; Trudy et al., 1999).

Além da caracterização microbiológica, outro parâmetro muito utilizado para avaliação de índices produtivos é a análise da histologia intestinal. Esta está relacionada principalmente a questões nutricionais como absorção e aproveitamento de nutrientes. O estudo da mucosa intestinal, por exemplo, é um aspecto relevante na fisiologia da digestão, pois ela é uma área de grande exposição a agentes que estão presentes no lúmen digestivo a partir do início da ingestão, digestão e absorção de nutrientes (Maiorka et al., 2000).

Considerando as evidências de que probióticos multiespécies (contendo mais de uma espécie bacteriana) são mais efetivos que probióticos monoespécies e que diferentes bactérias levam a diferentes efeitos (Timmerman et al., 2004 e 2005), o presente estudo teve como objetivo verificar o comportamento *in vivo* de bactérias selecionadas de frangos caipira, submetidas a testes de caracterização probiótica *in vitro*. Foi avaliado o probiótico multiespécie contendo duas cepas de *Enterococcus gallinarum* (F3 e F15), duas de *E. faecalis* (papo e ceco), uma de *Lactobacillus acidophilus*, e uma de *Bacillus subtilis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A combinação das bactérias selecionadas após isolamento seletivo, identificação, caracterização molecular e testes de caracterização probiótica (duas cepas de *Enterococcus gallinarum* - F3 e F15, duas de *E. faecalis* - papo e ceco, uma de *Lactobacillus acidophilus*, e uma de *Bacillus subtilis*) relatadas no capítulo 2, foi utilizada para testes de inoculação, verificando-se alguns parâmetros produtivos e alterações na histologia intestinal.

3.1 Testes *in vivo*

As bactérias selecionadas foram utilizadas nos testes: inoculação *in ovo* ou fornecimento direto.

3.1.1 Inoculação *in ovo*

Ovos embrionados da empresa Sadia S.A. (frangos de corte) foram inoculados com as bactérias selecionadas para o probiótico: dois isolados de *E. gallinarum*, dois de *E. faecalis*, dois de *L. acidophilus*, e um de *B. subtilis*. A inoculação foi realizada no 18º dia de incubação, na câmara de ar, utilizando-se agulha de 13,0 x 4,5 mm.

Para inoculação do probiótico, o ovo foi previamente submetido à ovoscopia, verificando-se a viabilidade do embrião e a marcação com lápis da região da câmara de ar. Foi ainda realizada assepsia com álcool iodado no local onde o furo seria feito. Para perfurar a casca utilizou-se um estilete redondo, previamente esterilizado, permitindo-se comunicação da agulha com o interior da câmara de ar. O furo foi fechado utilizando-se cola atóxica. (Figuras 12, 13 e 14).



Figura 12. Ovoscópio utilizado para verificação de viabilidade e embrionária e marcação da câmara de ar.

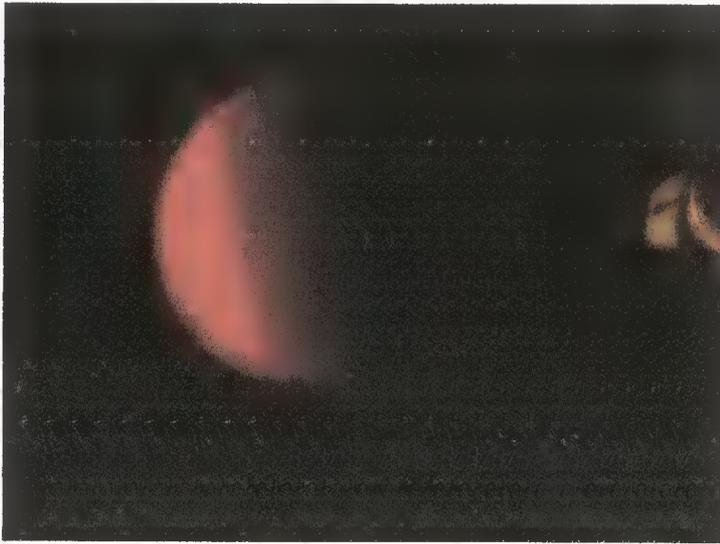


Figura 13. Ovo submetido à ovoscopia. A área mais clara da região avermelhada corresponde à câmara de ar.



Figura 14. Inoculação *in ovo* de 0,1ml de probiótico, utilizando-se seringa de 1ml. Observa-se marcação do limete da câmara de ar a lápis, para orientação do local de perfuração da casca em embriões aos 18 dias de incubação.

O inóculo foi preparado utilizando-se quantidade conhecida de cada uma das bactérias. A quantidade inoculada foi de 10^3 UFC/100 μ l, padronizada utilizando-se a concentração de células aferida na leitura em espectrofotômetro com OD_{600nm} de 0,6 (Tabela 3) para cada um dos isolados.

As cepas foram testadas separadamente e misturadas, anotando-se alterações na eclodibilidade e peso do pinto ao nascer, comparados com o grupo controle não inoculado.

Os tratamentos foram: 1 – Controle inoculado com PBS; 2 – *B. subtilis*; 3 – *E. gallinarum* e *E. faecalis*; 4 – *L. acidophilus*; 5 – Mix Probiótico (dois isolados de *E. gallinarum*, dois de *E. faecalis*, dois de *L. acidophilus*, e um de *B. subtilis*). Em cada grupo, 28 ovos foram analisados. Só foram utilizados os ovos considerados viáveis aos 18 dias de incubação.

3.1.2 Colonização intestinal de frangos até 23 dias

Foram testados os seguintes parâmetros para cada um dos tratamentos: peso, aparência do lote e taxa de recuperação das bactérias após inoculação. Foram utilizados Grupos contendo 30 animais cada; estes, provenientes dos ovos inoculados com os diferentes tratamentos (1 – Controle inoculado com PBS; 2 – *B. subtilis*; 3 – *E. gallinarum* e *E. faecalis*; 4 – *L. acidophilus*; 5 – Mix Probiótico). Além desses parâmetros, 10 animais de cada tratamento foram escolhidos ao acaso e submetidos à análise histológica de diferentes trechos do trato gastrointestinal por microscopia ótica.

Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e umidade. Foram utilizadas gaiolas metabólicas de 1m² com bandejas de retenção de excretas (limpas e desinfetadas diariamente após coleta para análise microbiológica). As aves de diferentes grupos não tiveram contato direto umas com as outras, diminuindo as chances de contaminação cruzada. A taxa de lotação utilizada foi de 28 aves por m², porém as aves foram mantidas alojadas somente até os 23 dias de idade. Água e ração foram fornecidas à vontade. Segundo informações da empresa fabricante da ração comercial utilizada (aves corte inicial – COMIGO), a mesma apresentava na sua composição 50g/ton de melhorador de desempenho na forma antibiótico; contudo, o tipo de melhorador de desempenho utilizado não foi informado. Antes do abate (19 e 23 dias de idade), para análise histológica, foi aplicado jejum alimentar de 15hs.

Depois de submetidas ao crescimento em meios específicos (Caldo BHI para *B. subtilis*; Lactobacilli MRS Broth para *L. acidophilus*; Enterococcosel Broth para *E. gallinarum* e *E. faecalis*), utilizou-se espectrofotômetro com OD_{600nm} para verificar a concentração de células fornecida a cada um dos diferentes tratamentos. Baseando-se na concentração de células na OD_{600nm} de 0,6 (Tabela 3) foi calculado o volume a ser administrado de cada uma das bactérias. Após centrifugação por 5 min a 3.000 rpm, o meio de cultura das diferentes bactérias foi descartado, e o pelet formado no fundo do tubo, re-suspendido em PBS. O procedimento de centrifugação foi realizado duas vezes para evitar a presença de meio de cultura no inóculo. Dessa forma, padronizando-se a concentração de cada uma das bactérias para 10⁷ UFC/0,1ml; administrou-se 0,1ml de suspensão de células para cada animal, de acordo com o Tratamento.

- a) CN (Controle negativo) – cada animal recebeu 0,1ml de PBS
- b) BS (*Bacillus*) – cada animal recebeu 0,1ml de suspensão contendo 10⁷ UFC de *Bacillus subtilis*
- c) EGF (*Enterococcus*) – cada animal recebeu 0,1ml de suspensão contendo 10⁷ UFC de *E. gallinarum* (F3 e F15) e *E. faecalis* (papo e ceco).
- d) LA (*Lactobacillus*) – cada animal recebeu 0,1ml de suspensão contendo 10⁷ UFC de *Lactobacillus acidophilus*.
- e) MIX (Mix probiótico) – cada animal recebeu 0,1ml de suspensão contendo 10⁷ UFC de cada uma das bactérias (*Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Bacillus*)

O controle negativo, composto por animais livres de probiótico, tanto na fase de incubação quanto na fase de desenvolvimento recebeu o mesmo tratamento alimentar dos demais grupos.

O probiótico foi fornecido às aves previamente colonizadas (inoculação *in ovo*) aos 5, 9, 12, 15 e 18 dias de idade.

3.1.2.1 Pesagem

O peso foi aferido no dia do nascimento (d0), seguido por pesagens nos dias 1, 5, 9, 12, 15 e 18. Considerou-se o alojamento das aves como dia 1 (d1). O procedimento foi realizado pesando-se um animal por vez e os dados submetidos à análise estatística para verificação de possíveis diferenças entre os grupos. Foi utilizada balança analítica de precisão.

3.1.2.2 Histomorfometria

Cinquenta animais (N=50), dez de cada grupo, foram eutanaziados, inicialmente insensibilizados pelo deslocamento da articulação atlanto-occipital e esperando a posterior parada cardio-respiratória para posteriormente coletar trechos do trato gastrointestinal para análise histológica. Foram amostradas cinco aves um dia após o fornecimento do probiótico e cinco quatro dias após o fornecimento.

3.1.2.2.1 Processamento dos Materiais

Foram retirados segmentos de aproximadamente 2 cm das seguintes regiões: papo, intestino delgado (curva da alça duodenal), intestino grosso (reto, IG) e ceco proximal (os dois). Os fragmentos dos órgãos foram acondicionados em frascos de vidro contendo solução de água destilada e formol a 10% (Tolosa et al., 2003). Os segmentos de intestinos foram divididos transversalmente ao meio, sendo uma parte rearmazenada e identificada individualmente e a outra parte destinada à microscopia de luz convencional. O material preparado para microscopia de luz convencional foi: desidratado em álcool, diafanizado por xilol e incluído em parafina. Após a inclusão o material foi cortado transversalmente por microtomia em secções de 5µm de espessura, sendo as fitas obtidas transferidas para o banho-maria a 40°C. Os cortes foram distendidos na superfície da água e depois dispostos em lâminas (Tolosa et al., 2003). Foram preparadas duas lâminas, com dois cortes para cada ave.

3.1.2.2.2 Coloração das Lâminas

Para a coloração foi utilizada a metodologia de hematoxilina-eosina. As lâminas foram desparafinadas em estufa a 60°C por 12 horas e a seguir em três banhos de xilol. A seguir, estas foram imersas em série decrescente de álcoois. Depois foram lavadas em água corrente por 15 minutos. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Meyer por 15 minutos. O excesso de corante foi lavado em água corrente por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas em eosina por 12 segundos e lavadas em água destilada por 4 segundos. Seguiu-se à coloração, a desidratação das lâminas em série crescente de álcoois e imersão em três banhos de xilol. A montagem das lâminas foi feita com lamínula e Entelan.

3.1.2.2.3 Análises histológicas

A morfologia do tecido foi graduada e as análises de espessura da mucosa do IG (EMIG), espessura da muscular do IG (EMRIG), altura das vilosidades do ID (AVID), largura das vilosidades do ID (LVID), profundidade da cripta do ID (PCID), espessura da mucosa do ID (EMID), espessura da muscular do ID (EMRID), espessura do ceco (EC), espessura da muscular do papo (EMRP), espessura do epitélio estratificado pavimentoso do papo (EEP) e espessura da mucosa do papo (EMP) foram obtidas utilizando-se o programa ImageTool 3.0®.

Para todas as medidas, 4 seções para cada segmento por ave, foram consideradas. A média de 5 medições em cada seção foi considerada para análise estatística (20 medições por segmento em cada ave). Foram mensurados de cada ave amostrada: 10 alturas das vilosidades intestinais, 5 médias de largura de vilosidades (mensurada na base do vilo) e 10 alturas das criptas (glândulas de Lieberkühn), (Alvarenga et al., 2004). Foram calculados as médias e desvios padrão de cada variável, em cada idade, para cada segmento intestinal avaliado. Os valores do ceco e do papo foram obtidos a partir da média de 10 medições.

A descrição de cada medida está especificada nas figuras 15 a 18.



Figura 15. Corte histológico de Intestino Delgado (curva da alça duodenal): a altura do vilão foi mensurada da ponta do mesmo até a base, não incluindo a cripta intestinal (A1 – A2); a largura do vilão foi mensurada na base do vilão (B1 – B2); a espessura da mucosa foi considerada como a medida entre a lâmina própria e a luz (C1 – C2); a espessura da muscular foi mensurada da serosa até a lâmina própria (D); a profundidade da cripta foi mensurada da lâmina própria até o início da vilosidade (E).



Figura 16. Corte histológico de intestino grosso (reto): a espessura da mucosa foi considerada como a medida entre a lâmina própria e a luz (A1 – A2); a espessura da muscular foi mensurada da serosa até a lâmina própria (B). Realizadas 20 medições por segmento em cada ave.



Figura 17. Corte histológico de Ceco: a espessura do ceco foi mensurada entre a luz do órgão e serosa (A1 – A2). Realizadas 20 medições por segmento em cada ave.

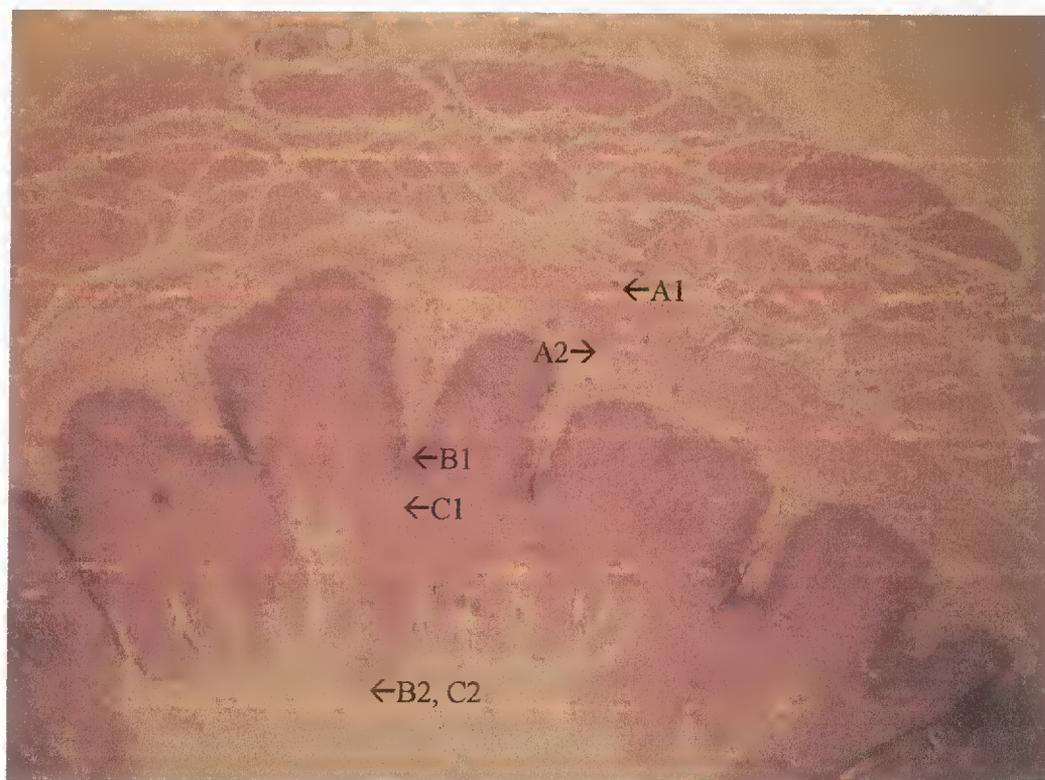


Figura 18. Corte histológico de Papo: a espessura da muscular do papo foi considerada abrangendo somente a muscular da mucosa (A1 – A2); a espessura da mucosa do papo foi mensurada da lâmina própria até a luz do órgão, abrangendo a camada do epitélio estratificado pavimentoso (B1 – B2); espessura do epitélio estratificado pavimentoso (C1 – C2).

3.1.2.3 Análise microbiológica

Durante o crescimento dos animais foram coletadas amostras fecais, e estas submetidas a isolamento e contagem bacteriana, analisando-se as principais bactérias recuperadas quanto à espécie e quantidade por meio de diluições seriadas (de 10^{-1} até 10^{-6}) e leitura das placas para contagem de colônias. Foram utilizados meios específicos (para lactobacilos – Lacobacilli MRS, Difco(R)) e inespecíficos (para as demais bactérias – BHI, Difco), analisando-se a taxa de decréscimo da bactéria fornecida. Até quando ela foi dominante e até quando estava presente em concentrações acima de 10^3 ufc. A identificação das bactérias utilizadas no presente estudo seguiram as mesmas metodologias referidas no capítulo 2 desta tese.

Para identificação das demais colônias foram realizados os testes de Gram (positivo ou negativo, permitindo ainda classificação em cocos ou bastonetes) e catalase, seguidos por testes bioquímicos recomendados por Quinn et al.(1994).

As coletas foram realizadas em frascos estéreis contendo solução salina, de forma que as excretas eram diluídas no primeiro momento a 10^{-1} . A contagem das células foi realizada com auxílio de contador digital, visualizando-se as colônias através de lupa.

3.1.3 Análise estatística

Os procedimentos GLM (análise de variância), CORR (correlação) e PRINCOMP (componentes principais) do programa SAS® foram utilizados para analisar os dados. A análise de variância investigou o efeito do tratamento (Controle Negativo, *Bacillus subtilis*, Enterococos, *L. acidophilus*, Mix) e idade dos animais (d0, d1, d5, d9, d12, d15, d18) sobre os pesos e medidas histológicas. A comparação das idades para as análises histológicas utilizou o teste de Duncan ($p < 0.05$). As correlações e componentes principais investigaram as relações entre os pesos e medidas histológicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes *in vivo*

4.1.1 Inoculação *in ovo*

Depois da inoculação das bactérias *in ovo* aos 18 dias de incubação, foi observada boa eclodibilidade aos 21 dias para todos os tratamentos. Os grupos 3 (enterococos) e 4 (lactobacilos) foram os únicos que não apresentaram 100% de eclodibilidade dos animais inoculados. Foram observados problemas relacionados à não internalização do saco vitelínico nos grupos 2, 3 e 4. (Tabela 6 e Figura 19)

Tabela 6. Eclodibilidade, mortalidade pós-nascimento e principais problemas relacionados nos diferentes grupos estudados.

Grupo	Eclodibilidade	Mortalidade pós-nascimento	Observações
(1) Controle negativo	100% (28:28)	1/28	Problema locomotor
(2) <i>B. subtilis</i>	100% (28:28)	1/28	Não internalizou saco vitelínico
(3) <i>Enterococcus</i>	93% (26:28)	2/26	Não internalizaram saco vitelínico
(4) <i>L. acidophilus</i>	96,5% (27:28)	1/27	Não internalizou saco vitelínico
(5) Mix	100% (28:28)	1/28	Problema locomotor

Edens et al. (1997) demonstrou que a administração de probiótico *in ovo* e fornecimento direto podem resultar em aumento da altura das vilosidades, demonstrando que probióticos são potencialmente capazes de melhorar a absorção de nutrientes e por fim melhorar a performance de crescimento e eficiência alimentar de frangos. As análises do peso e da histologia intestinal das aves do presente estudo confirmaram em alguns aspectos essa afirmação.



Figura 19. Pinto de um dia demonstrando não internalização do saco vitelínico (seta). Animal proveniente do grupo 3 (*Enterococcus*) morreu no primeiro dia de vida.

4.1.2 Colonização dos frangos até os 23 dias de idade

4.1.2.1 Análise microbiológica

O resultado da coleta de amostras fecais no primeiro dia de vida de todos os grupos demonstrou que a inoculação *in ovo* foi eficiente na colonização dos pintos (Tabela 8).

O grupo controle, não inoculado com bactérias probióticas, apresentou crescimento apenas de *Enterococcus faecalis* em diluições acima de 10^{-6} . A partir do segundo dia de vida, considerando-se a mesma diluição, amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. passaram a ser predominantes, encontrando-se ainda, em menor quantidade, colônias isoladas de *E. faecalis*. No quarto dia de coleta e análise microbiológica, a diluição de 10^{-6} demonstrou dominância de *E. coli* e *Klebsiella* spp, sendo essas as únicas bactérias identificadas nesta concentração.

No grupo 2, que recebeu *B. subtilis*, só foi possível a recuperação da cepa na diluição de 10^{-3} , no primeiro e segundo dias de vida. A partir do terceiro dia, não foram encontradas colônias sugestivas de *B. subtilis* em nenhuma das diluições. Cepas de *E. coli*, *Klebsiella* spp e *E. faecalis* foram encontradas seguindo o mesmo comportamento do grupo controle.

O grupo 3, inoculado com enterococos, obteve sucesso na colonização *in ovo*, permitindo a recuperação na diluição de 10^{-6} tanto de *E. faecalis*, quanto de *E. gallinarum*, ambos identificados por testes fenotípicos e por PCR. Até o terceiro dia as duas espécies de enterococos permaneceram em quantidade superior à segunda bactéria, *Escherichia coli*. A partir do quarto dia as colônias de *E. coli* e *Klebsiella* spp passaram a dominar a diluição de 10^{-6} , dois dias após o grupo controle e o grupo 2 (*B. subtilis*).

O grupo 4, inoculado com *L. acidophilus*, apresentou comportamento semelhante ao grupo dos enterococos quanto à taxa de decréscimo. Porém, no terceiro dia, apesar da presença de colônias na diluição de 10^{-6} , estas eram muito inferiores à dominante *E. coli*.

O grupo 5, que recebeu o probiótico multiespécies, permitiu o isolamento de cepas de *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *L. acidophilus* na diluição de 10^{-6} até o terceiro dia, porém não foi observada a presença de colônias sugestivas de *B. subtilis* em nenhuma das diluições utilizadas desde o primeiro dia de vida dos pintinhos. Esse fato confirma que cepas de *B. subtilis* no estado vegetativo são sensíveis às condições de incubação *in ovo*, provavelmente pela competição por nutrientes com outras bactérias ali presentes e pela produção de ácidos orgânicos pelas duas famílias de bactérias ácido lácticas administradas concomitantemente: enterococos e lactobacilos. (Netherwood, 1999; Nicholson, 2002; Vahjen, 2002; Nguyen et al., 2006).

Resultados do grupo controle para o início da dominância por *E. coli* e *Klebsiella* foram inferiores aos tratamentos contendo as bactérias ácido-lácticas. Mesmo com a utilização de ração contendo melhorador de desempenho, as bactérias utilizadas, seja por grupo bacteriano ou no mix foram recuperadas posteriormente o que demonstra o pouco efeito que o melhorador de desempenho teve sobre eles (Tabela 7).

Tabela 7. Duração (dias) da colonização intestinal após inoculação “*in ovo*” aos 18 dias de incubação.

Grupos	<i>E. faecalis</i> (dias) *	<i>E. gallinarum</i> (dias) *	<i>L. acidophilus</i> (dias) *	<i>B. subtilis</i> (dias) **	Início da dominância por <i>E. coli e Klebsiella sp</i> (dias) ***
(1) Controle	2	-	-	-	2
(2) <i>B. subtilis</i>	-	-	-	2	2
(3) <i>Enterococcus</i>	3	3	-	-	4
(4) <i>L. acidophilus</i>	-	-	3	-	3
(5) Mix	3	3	3	-	3

* Encontradas colônias em diluições de até 10^{-6}

** Encontradas colônias em diluições de até 10^{-3}

*** Encontradas colônias em diluições de 10^{-6} ou maiores.

Após o terceiro dia, verificou-se que todas as bactérias probióticas administradas, até então dominantes (com exceção do *B. subtilis*), estavam em quantidades semelhantes ou menores que as demais (*Escherichia coli* e *Klebsiella spp*), deixando de ser as mais prevalentes nos isolamentos (Figura 20). Foi adotado então o intervalo de 4 dias para o fornecimento do probiótico. A taxa de decréscimo das bactérias de acordo com o avanço da idade das aves continuou e o intervalo de fornecimento utilizado após o nono dia de idade foi de 3 dias. O probiótico foi então fornecido nos mesmos dias das pesagens (5, 9, 12, 15 e 18 dias de idade).

As cepas de *B. subtilis* não foram mais isoladas, tanto no grupo 2 (BS), quanto no grupo 5 (mix probiótico). Esse comportamento, mais uma vez comprova a alta sensibilidade desta cepa na forma vegetativa apresentada nos resultados do capítulo 2 desta tese, com alta taxa de inibição do crescimento por sais biliares aliada a outras condições como o baixo pH, principalmente durante passagem pelo pró-ventrículo, a ausência de oxigênio e a competição com bactérias comensais. (Nicholson, 2002; Barbosa et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Os demais grupos (3, 4 e 5) apresentaram compartimentos similares tanto na taxa de recuperação após fornecimento do probiótico, quanto na interferência na quantidade de colônias de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp*. (bactérias dominantes) encontradas em diluições de 10^{-6} . As cepas de lactobacilos e enterococos foram encontradas em diluições de 10^{-4} , um dia após

fornecimento do probiótico, até 10^{-2} , três dias após o fornecimento. Comparadas com o grupo controle, a concentração de colônias de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp foi menor nos grupos que receberam lactobacilos, enterococos, ou a combinação destes (mix probiótico), sendo encontradas até as diluições de 10^{-6} ; no grupo controle a partir do terceiro dia de vida, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp foram encontradas em concentrações superiores a 10^{-7} .

Para as administrações seguintes, com 9, 12, 15 e 18 dias de idade foi observado o mesmo comportamento das coletas após o dia cinco.

As características de resistir ao pH gástrico e aos sais biliares são importantes para o sucesso de entrada das bactérias no trato gastrointestinal. Nesse contexto, a resistência demonstrada pelos isolados no capítulo 2 foi importante para que essas bactérias demonstrassem suas características probióticas e colonizassem a ave (Motata et al., 2006).

O baixo pH e o ácido clorídrico presentes no estômago, são as primeiras barreiras encontradas pelos microrganismos ingeridos juntamente com os alimentos. Aqueles que conseguem sobreviver à digestão gástrica podem interagir com a microbiota gastrintestinal (Souza et al., 2007). Alguns pesquisadores consideram de fundamental importância, a tolerância do suco gástrico e aos sais biliares pelas bactérias de um probiótico (Hoyos, 1997; Jin 1998).



Figura 20. *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no grupo 55 (mix probiótico) na diluição de 10^{-6} . Coleta realizada de animais com 4 dias de idade. As bactérias probióticas (*B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *L. acidophilus*) já não foram mais encontradas nesta diluição e deixaram de ser dominantes.

4.1.2.2 Aparência do lote

Não foi notada diferença entre os diferentes tratamentos quando avaliada a aparência do lote. Durante os sete primeiros dias do teste o grupo que recebeu a cepa de *L. acidophilus*, foi o único a apresentar animais com a cloaca suja (Figura 21). Até esse dia, a incidência média nesse grupo foi de 3 animais com cloaca suja em 26 (11,54%). Os demais grupos apresentaram no máximo um animal por vez; a frequência para esses não foi regular.

É interessante destacar que o grupo 5, contendo *L. acidophilus* em sua composição, em associação com outras bactérias, não teve aves com a cloaca suja.



Figura 21. Animal do grupo 4 (*Lactobacillus acidophilus*) apresentando cloaca “suja”.

4.1.2.3 Pesagem dos animais

Não houve diferença significativa quando comparadas as médias dos pesos dos diferentes tratamentos analisados nos dias 0, 1, 5, 9, 12, 15 e 18. Os tratamentos que receberam bactérias probióticas não apresentaram resultados com diferença significativa quanto ao ganho de peso.

Apesar da não obtenção de resultados com diferença significativa entre os grupos neste trabalho, não houve prejuízo ao desempenho com a utilização do probiótico (Tabela 9 e Figura 22); outros autores relataram a resposta no ganho de peso de aves tratadas com probiótico composto por essas bactérias, atestando que houve resultado positivo para essa combinação (Dobrogosz et al, 1991; Tournut, 1998; Jim et al., 1998; Silva, 2000).

Timmerman et al. (2006) demonstraram porém que, apesar de favoráveis a um ligeiro aumento na produção, animais com alta produtividade tendem a ter respostas mais discretas quanto ao efeito dos probióticos. No presente estudo, foi utilizada ração comercial que, seguindo as características de produção atuais, continha melhoradores de desempenho. Essa composição pode ter colaborado para o não aparecimento de diferenças no peso das aves.

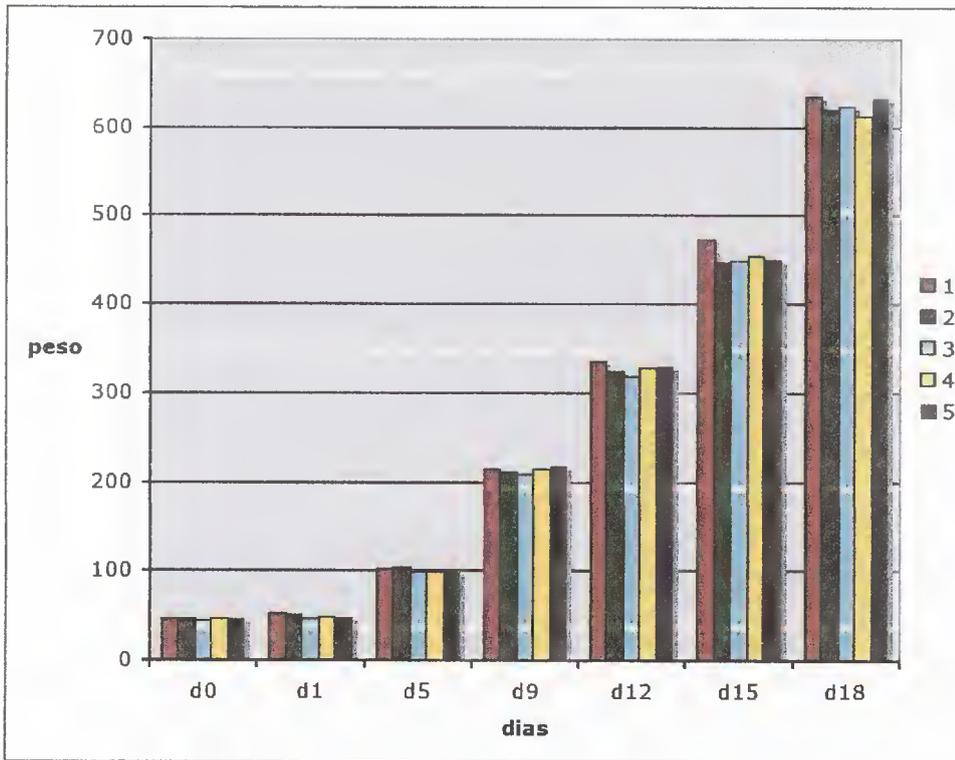


Figura 22. Peso médio (gramas) dos animais nos dias 0, 1, 5, 9, 12, 15 e 18. Grupo 1 (vermelho) – controle negativo; Grupo 2 (verde) – *Bacillus subtilis*; Grupo 3 (azul) – *Enterococcus*; Grupo 4 (amarelo) – *Lactobacillus acidophilus*; Grupo 5 (roxo) – mix probiótico.

Tabela 8. Peso médio (gramas) das aves nos dias 0, 1, 5, 9, 12, 15 e 18. Grupo 1 – controle negativo; Grupo 2 – *Bacillus subtilis*; Grupo 3 – *Enterococcus*; Grupo 4 – *Lactobacillus acidophilus*; Grupo 5 – mix probiótico.

	d0	d1	d5	d9	d12	d15	d18
Grupo 1	47,32	51,23	102,39	213,67	334,68	472,64	634,64
Grupo 2	46,27	49,62	103,88	211,12	323,89	446,66	620,64
Grupo 3	44,65	47,40	99,42	208,88	319,24	448,51	624,17
Grupo 4	46,56	48,68	98,14	213,88	327,71	455,09	612,18
Grupo 5	46,74	47,84	101,29	217,02	329,40	450,18	632,63

4.1.2.4 Histologia do TGI

Os resultados histológicos demonstraram diferenças significativas para alguns dos cortes realizados, comparando as medidas entre os diferentes grupos (1 – Controle inoculado com PBS; 2 – *Bacillus subtilis*; 3 – *E. gallinarum* e *E. faecalis*; 4 – *Lactobacillus acidophilus*; 5 – Mix Probiótico) e entre as diferentes idades de abate (um e quatro dias após o fornecimento dos probióticos). Apesar de verificada diferença significativa quando avaliadas separadamente, não houve diferença quando feita a correlação entre idade e grupos.

A análise dos componentes principais das para medidas histológicas no trato gastrointestinal em aves (Figura 23) mostra que, no primeiro momento, os animais mais novos tiveram medidas mais altas de espessura muscular do IG, ID e papo, espessura do mucoso do IG e papo bem como largura das vilocidades do ID e profundidade das criptas. No segundo momento houve um subgrupo de animais mais velhos, com maior espessura do ceco, do epitélio estratificado pavimentoso do papo e da mucosa do ID e menor largura das vilocidades do ID e profundidade das criptas. Isto pode ter acontecido porque não houve fornecimento do probiótico por 4 dias. O probiótico aumenta a altura e largura de vilocidade e profundidade do cripto (Edens et al., 1997; Jin et al., 1998, 2000; Zulkifli et al., 2000; Kalavathy et al., 2003). Assim os animias sem probiótico não teriam este efeito benéfico.

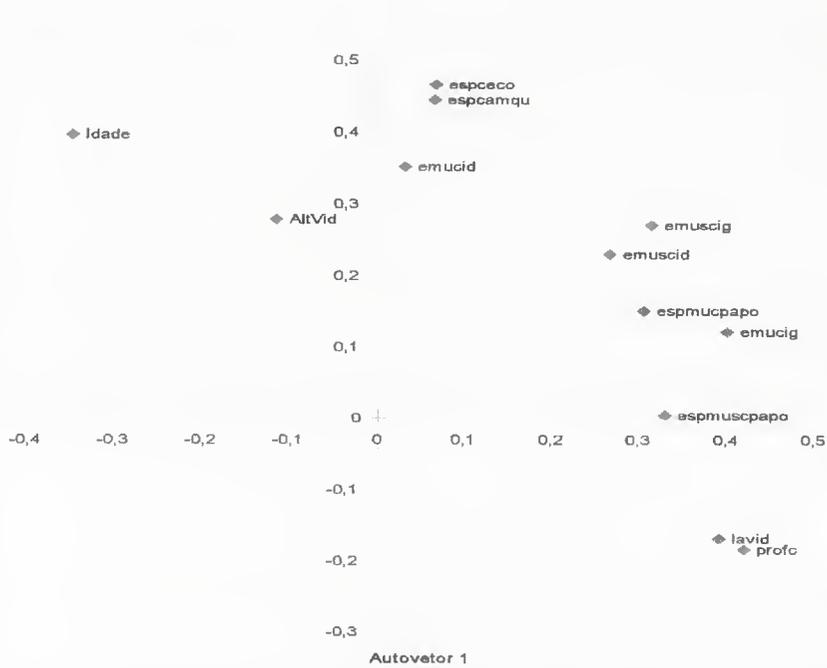


Figura 23. Primeiros dois componentes principais para medidas histológicas no trato gastrointestinal em aves.

Edens et al. (1997) demonstrou que a administração de probiótico contendo bactérias ácido lácticas *in ovo* e *ex ovo* pode resultar em aumento da altura das vilosidades, demonstrando que probióticos são potencialmente capazes de melhorar a absorção de nutrientes e por fim melhorar a performance de crescimento e eficiência alimentar de frangos. Apesar de não haver diferença entre os pesos corporais nos diferentes tratamentos utilizados, a análise da histologia intestinal das aves do presente estudo confirmou algumas alterações benéficas dos probióticos dependendo do segmento analisado.

4.1.2.4.1 Intestino Delgado

Comparado ao grupo controle e ao grupo 4 (lactobacilos), o grupo 3, tratado com enterococos, teve a espessura da mucosa do ID (região da alça duodenal) significativamente maior (Tabela 9).

Não houve diferença significativa quando comparada a largura das vilosidades entre os grupos. Já para altura das vilosidades e profundidade das criptas, o grupo 5, inoculado com o probiótico multiespécies, apresentou resultados promissores, com diferenças significativas ($p < 0,01$) do grupo controle (Tabela 9). Timmerman et al. (2006) relatou resultados similares

obtidos com administração de lactobacilos; sabe-se ainda que grande parte dos trabalhos referem-se a interferência da administração de probióticos principalmente na altura dos vilos, concordando com o presente estudo (Jin et al., 1998, 2000; Zulkifli et al., 2000; Kalavathy et al., 2003).

Fatores estressantes podem contribuir na diminuição do tamanho de vilosidades e criptas intestinais, refletindo negativamente na absorção de nutrientes. Award et al. (2006) relatou que o uso de probióticos frente a eventos estressantes, como a presença de micotoxinas no alimento dos frangos, pode ser uma boa ferramenta para diminuir esses efeitos negativos.

4.1.2.4.2 Intestino Grosso

Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos quando comparada espessura da camada muscular do intestino grosso. A espessura da mucosa porém, foi significativamente maior nos animais tratados com *L. acidophilus* (grupo 4), quando comparada aos grupos 1, 2 e 3 (controle, bacilos e enterococos); e semelhante ao grupo 5, que recebeu a mistura de todas as bactérias. (Tabela 9)

O estudo da mucosa intestinal é extremamente relevante na fisiologia da digestão, pois ela é uma área de grande exposição a agentes que estão presentes no lúmen digestivo a partir do início da ingestão, digestão e absorção de nutrientes. No intestino grosso, a maior espessura da camada mucosa pode resultar em uma melhor absorção de alguns nutrientes (Maiorka et al., 2000).

4.1.2.4.3 Ceco

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para os cortes realizados no ceco.

4.1.2.4.4 Papo

Houve diferença significativa entre a espessura do epitélio estratificado pavimentoso do papo quando analisados os diferentes grupos. Aqueles inoculados com o probiótico multiespécies e com *L. acidophilus* mostraram maior espessura dessa camada quando comparados ao grupo

controle (1) e ao grupo 2 (*B. subtilis*). Não houve diferença, entretanto para o grupo 3 (enterococos). (Tabela 9)

Esse aumento na espessura do papo pode ser atribuído à presença das bactérias ácido lácticas (lactobacilos e enterococos) que, ao produzirem ácidos orgânicos resultantes da fermentação de carboidratos, acidificam o meio e estimulam a proliferação celular (Netherwood, 1999; Vahjen, 2002; Loddi, 2002).

Tabela 9. Medidas histológicas de diferentes trechos do TGI de frangos submetidos a diferentes tratamentos com bactérias probióticas

	EMID	AVID	LVID	PC	EMRID	EMP	EEP	EMRP	EC	EMRIG	EMIG
Grupo1	228,71 b	1489,20 b	210,25	144,780 c	208,66 b	703,16	318,93 c	179,98	502,3	619,9	546,62 b
Grupo2	265,32 a,b	1562,01 a,b	237,59	173,561 a	258,42 a	654,84	348,29 b,c	196,74	527,88	692,63	580,42 b
Grupo3	297,34 a	1504,63 b	241,21	148,696 b,c	209,67 b	670,96	368,21 a,b,c	171,56	515,68	583,37	545,82 b
Grupo4	241,16 b	1555,41 a,b	225,56	151,249 b,c	214,93 b	692,91	427,55 a	187,76	536,39	634,28	697,52 a
Grupo5	272,69 a,b	1688,38 a	237,83	167,371 a,b	211,81 b	644,39	399,01 a,b	207	508,57	642,22	653,30 a,b

* letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa, $p < 0,01$.

* espessura da mucosa do IG (EMIG), espessura da muscular do IG (EMRIG), altura das vilosidades do ID (AVID), largura das vilosidades do ID (LVID), profundidade da cripta do ID (PC), espessura da mucosa do ID (EMID), espessura da muscular do ID (EMRID), espessura do ceco (EC), espessura da muscular do papo (EMRP), espessura da mucosa do papo (EMP) e espessura do epitélio estratificado pavimentoso do papo (EEP).

* grupos: 1 – Controle; 2 – *B. subtilis*; 3 – *E. gallinarum* e *E. faecalis*; 4 – *L. acidophilus*; 5 – Mix Probiótico (Todas as bactérias).

Tabela 10: medidas histológicas de diferentes trechos do TGI de frangos um (id19) e quatro (id23) dias após o fornecimento do probiótico.

	EMID	AVID	LVID	PC	EMRID	EMP	EEP	EMRP	EC	EMRIG	EMIG
Id19	243,68 b	1497,09 b	259,619 a	180,738 a	227,72	700,05	341,80 b	198,73	481,66 b	634,88	628,55
Id23	278,41 a	1628,21 a	199,695 b	132,893 b	213,85	646,46	403,00 a	178,48	554,67 a	636,27	577,37

* letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa, $p < 0,01$.

* espessura da mucosa do IG (EMIG), espessura da muscular do IG (EMRIG), altura das vilosidades do ID (AVID), largura das vilosidades do ID (LVID), profundidade da cripta do ID (PC), espessura da mucosa do ID (EMID), espessura da muscular do ID (EMRID), espessura do ceco (EC), espessura da muscular do papo (EMRP), espessura da mucosa do papo (EMP) e espessura do epitélio estratificado pavimentoso do papo (EEP).

5 CONCLUSÃO

A inoculação *in ovo* aos 18 dias de incubação mostrou-se um procedimento eficaz para colonização intestinal por bactérias probióticas, com boas taxas de recuperação nos primeiros dias de vida.

Os enterococos e os lactobacilos estudados demonstraram que são eficientes em colonizar o intestino das aves, mas que sua manutenção nesse ambiente como bactérias dominantes não ultrapassa três dias, fazendo-se necessária a administração frequente do probiótico para que os efeitos sejam obtidos. A forma vegetativa da estirpe de *B. subtilis* não é viável para utilização como probiótico. No presente estudo esta estirpe não colonizou o TGI.

O uso de bactérias probióticas, principalmente a mistura das bactérias estudadas (mix probiótico) demonstrou características interessantes à produção avícola, aumentando a altura das vilosidades do intestino delgado e a profundidade das criptas. Foi favorável também ao aumento da espessura da camada do epitélio estratificado pavimentoso do papo e da espessura da mucosa do intestino grosso. Todas essas características estão intimamente relacionadas à melhor absorção de nutrientes. Não houve, porém diferenças significativas no ganho de peso dos animais.

CONCLUSÃO DOS CAPÍTULOS 2 E 3

PRODUTOS, IMPACTOS ESPERADOS E SUA IMPORTÂNCIA EVENTUAL PARA O DISTRITO FEDERAL

O trabalho demonstrou que é possível isolar, selecionar, caracterizar e utilizar bactérias de frangos caipira com potencial probiótico na produção comercial.

Segundo informações do Ministério de Agricultura, o Distrito Federal é a região com maior concentração de aves comerciais quando comparado com qualquer um dos estados da união. Situação similar pode ser observada na produção de suínos.

Esta situação nos leva a pensar no futuro, relacionando tanto o consumo interno (Brasil), quanto a exportação, voltando maior atenção às exigências dos mercados consumidores. A Comunidade Econômica Européia, a China e países do Oriente Médio são, na atualidade, nossos principais parceiros.

As exigências destes países estão relacionadas com aspectos como Saúde Pública (qualidade de produtos comercializados) e Bem-Estar Animal, com a emissão de selos de qualidade que nos permita rastrear os produtos até sua origem.

A atuação na Saúde Pública visa a comercialização de produtos livres de resíduos de antibióticos e outros tipos de medicamentos utilizados como promotores de crescimento na avicultura comercial. O tempo para cumprimento destas exigências implementadas pelos países compradores esta se esgotando, e 2012 deverá ser a data final para realização destas mudanças nos nossos sistemas de produção.

A Universidade de Brasília inserida dentro do Distrito Federal pode ser pioneira no desenvolvimento de probióticos com embasamento científico, que proporcionem segurança aos produtores de aves e outras espécies de animais no momento da substituição dos promotores de crescimento utilizados na atualidade. O resultado será uma proteção confiável, mediante a “exclusão competitiva”, contra bactérias patogênicas encontradas no meio ambiente.

A produção de probióticos pode estar inserida dentro do Parque Científico Tecnológico (PCT) que será implementado dentro do Campus da Universidade de Brasília, com isto o Distrito Federal estará se adiantando ao futuro da produção de animais de fazenda, gerando maiores lucros em todos os setores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M, BUTAYE, P, WOLGANG, W, **Nonhuman Reservoirs of Enterococci**, in: Gilmore, M. S., **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**, ASM Press, Washington, DC, 2002.

ABEF Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos, **Relatório anual 2008/2009**, online. In <<http://www.abef.com.br>>

ALBERTON, L. R. **Produção de xilanase em resíduos agroindustriais por *Streptomyces viridosporus* T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária**. Curitiba: Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, 2004. 133p. Tese (Doutorado em Saúde Animal) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ALMEIDA, R.F. **O fim de uma era**. Suinocultura industrial, n. 2/3, p. 24-27, 2000.

ALVARENGA, B. O.; BELETTI, M. E.; FERNANDES, E. A.; SILVA, M. M.; CAMPOS, L. F. B.; RAMOS, S. P. **Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte**. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 20, n. 3, p. 55-59, 2004.

ANDREATTI FILHO, R.L., CROCCI, A.J. **Efeito protetor da microbiota cecal congelada e liofilizada sobre a infecção experimental de frangos de corte por *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis***. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 54, p. 140-145, 2002.

ARMSTRONG, D.G. **Gut-active growth promoters, in Control and Manipulation of Animal Growth**, Butterworths, London, p. 21-37, 1986.

AWARD, W.A., BÖHM, J., RAZZAZI-FAZELI, E., GHAREEB, K., ZENTEK, J. **Effect of Addition of a Probiotic Microorganism to Broiler Diets Contaminated with Deoxynivalenol on Performance and Histological Alterations of Intestinal Villi of Broiler Chickens**, Poultry Science v.85, p. 974–979, 2006.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

- BARBOSA, T. M., SERRA, C.R. LA RAGIONE, R.M. WOODWARD, M.J. HENRIQUES, A.O. **Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract.** Applied Environmental Microbiology, v. 1, p. 968–978, 2005.
- BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. **ESTRUTURA FUNCIONAL DO TRATO DIGESTÓRIO.** IN: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte.** 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 75-95, 2002.
- CAJA, G. **Alternativas a los antibioticos de uso alimentario en ruminantes: probióticos, enzimas y orgánicos.** In: Curso de especializacion fedna. Madrid: octubre de 2003, p. 25.
- CARINA AUDISIO, M, OLIVER, G, APELLA, M C, **Protective effect of Enterococcus faecium J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with Salmonella Pullorum,** Journal of Food Protection, v.63, n.10, p. 1333-7, 2000.
- CHARTESIS, A. **Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species.** Journal of Food Protection, v. 61, n.12, p. 1636-1643, 1998.
- CHAVES, A.H., SILVA, J.F.C., PINHEIRO, A.J.R. et al. **Seleção de isolados de Lactobacillus acidophilus usados como probióticos em bezerras.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 28, n. 5, p. 1093-1101, 1999.
- CUNNINGHAM, J.G., **Tratado de Fisiologia Veterinária.** 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 450p. 2004.
- DABROGOSZ, 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.
- DALLOUL, R. A., H. S. LILLEHOJ, T. A. SHELLEM, AND J. A. DOERR. **Enhanced mucosal immunity against Eimeria acervulina in broilers fed a Lactobacillus-based probiotic.** Poultry Science. v. 82, p. 62–66, 2003.
- DANNY HOOGE, **Bacillus spores may enhance broiler perform,** Feedstuffs. Reprinted v. 75, n. 3, January 20, 2003.
- DECROOS, K, VERCAUTEREN, T, WERQUIN, G, VERSTRAETE, W, **Repression of Clostridium population in young broiler chickens after administration of a probiotic**

mixture, Communication in Agricultural and Applied Biological Science., v. 69, n. 1, p. 5-13, 2004.

DUTKA-MALEN, S. EVERS, S., COURVALIN, P., **Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR**, J Clinical Microbiology, v.33, n.1, pp 24-27, 1995.

EDENS, F.W. **An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics**. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v. 5, p. 1-40, 2003.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, p. 1-54, 2002.

FOX, S.M. **Probiotics: Intestinal inoculants for production animal**. Veterinary Medicine, v. 83, n.8, p. 806-830, 1988.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals**. Journal of Applied Bacteriology, v.66, p365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics, The scientific basis**. London. Chapman & Hall, 1992, 398p.

FULLER R: **Introduction**. In *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects* Edited by: Fuller R. New York, Chapman & Hall; 1-9. 1997.

GIL DE LOS SANTOS, J. R., O. B. STORCH, AND C. GIL-TURNES. ***Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella* Enteritidis**. British Poultry Science, v. 46, p. 494–497, 2005.

GUILLOT, J.F. **Como utilizar corretamente los probióticos en avicultura**. Avicultura Industrial, v. 19, p. 33-36, 2001.

GÜNTER KLEIN, **Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract**, International Journal of Food Microbiology, v.88, p. 123-131, 2003.

HAGHIGHI, H.R., GONG, J., GYLES, C.L., HAYES, M.A., ZHOU, H., SANEI, B., CHAMBERS, J.R., SHARIF, S. **Probiotics Stimulate Production of Natural Antibodies in Chickens**, Clinical and Vaccine Immunology, v. 13, n. 9, p. 975–980, 2006.

HOA NT, BACCIGALUPI L, HUXHAM A, SMERTENKO A, VAN PH, AMMENDOLA S, RICCA E, CUTTING AS. **Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders.** Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 12, p. 5241-7, 2000.

HOYOS, G. Aplicación de la biotecnología en la producción animal: la experiencia mexicana de una década. In: Simposio Mexicano sobre Probióticos. México: Ciudad Universitaria, 1997. 148p.

JIN, L.Z., HO, Y.W. ET. AL. **Probiotics in poultry: modes of action,** World Poultry Science Journal, v. 53, p. 351-368, 1997.

JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. **Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures.** Poultry Science, v. 77, p. 1259–1265, 1998.

JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. **Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures.** Poultry Science, v. 79, p. 886–891, 2000.

JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food,** London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002, 11p.

JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Background document for the Joint WHO/FAO/OIE expert, in: **Workshop on non-human antimicrobials usage and antimicrobials resistance scientific assessment,** Geneva, Switzerland, December 1-5, 2003, 117p.

KABIR, S. M. L., RAHMAN, M.M., RAHMAN, M.B., RAHMAN, M.M., AHMED., S.U. **The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers.** International Journal of Poultry Science, v. 3, p. 361–364, 2004.

KALAVATHY, R., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S., HO, Y.W. **Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens.** British Poultry Science, v. 44, p. 139–144, 2003.

KOENEN, M.E., KRAMER, J., VAN DER HULST, R., HERES, L., JEURISSEN, S. H., BOERSMA, M.W.J.A. **Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer and meat-type chickens.** *British Poultry Science*, v. 45, p. 355–366, 2004.

KOS, B., SUSKOVIC, J., VUKOVIC, S., SIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOSIC, S., **Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 981-987, 2003.

LAN, P.T.N., BINH, L.T., BENNO, Y. **Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken,** *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 49, p. 29-36, 2003.

LINE, E.J., BAILEY, S.J., COX, N.A., STERN, N.J., TOMPKINS., T. **Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers.** *Poultry Science*, v. 77, p. 405–410, 1998.

LODDI, M. M., **Probióticos e prebióticos na nutrição de aves,** Comissão de Tecnologias Avançadas do CFMV, UNESP Jaboticabal, 2002.

LYONS, T.P. **Biotechnology risk or revolution.** A review of Alltech's position. In: Proceedings of alltech's sixth annual symposium biotechnology in the feed industry, 6, Kentuck. Proceed. Kentuck. 1990.

MACARI, M. **A fisiologia do sistema digestivo das aves (I).** *Aves e ovos*, São Paulo, v. 15, n. 8/9, p. 12-20, jun 1999.

MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E. BORGES, S.A.; BOLELI, I.C. MACARI, M. **Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos.** *Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, 2000.

MENTEN J.F.M. **Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, Piracicaba, 2001. Anais.. Piracicaba: FEALQ, p.141-157, 2001.

MORISHITA, T.Y., AYE, P.P., HARR, B.S., COBB, C.W., CLIFFORD., J.R. **Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonizationshedding of *Campylobacter jejuni* in broilers.** *Avian Disease*, v. 41, p. 850–855, 1997.

MOTA, R.M., MOREIRA, J.L.S., SOUZA, M.R., HORTA, M.F., TEIXEIRA, S.M.R., NEUMANN, E., NICOLI, J.R., NUNES, A.C. **Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines**, *BMC Biotechnology*, v. 6, n. 2, 2006.

MUSIKASANG, H., TANI, A., H-KITTIKUN, MANEERAT, S. **Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 8, p. 1337-1345, 2009.

NETHERWOOD, T, GILBERT, H J, PARKER, D S, O'DONNELL, A G, **Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract**, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 5134-8, 1999.

NEUMANN, E. **Comportamento “in vitro” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991, 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1991.

NICHOLSON, W. L. **Roles of *Bacillus* endospores in the environment**. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 59, p. 410–416, 2002.

TAM, N.K.M., UYEN, N.Q., HONG, H.A., DUC, L.H., HOA, T.T., SERRA, C.R., HENRIQUES, A.O., SIMON, M. **Cutting The Intestinal Life Cycle of *Bacillus subtilis* and Close Relatives**, *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 7, p. 2692–2700, 2006.

NICOLI, J.R. **Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, v. 15, p. 183-190, 1995.

NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C., PENNA, F.J., VIEIRA, L.Q., RODRIGUES, A.C.P., NEUMANN, E., SILVA, A.M., LIMA FILHO, J.V.M., BAMBIRRA, E.A., ARANTES, R.M.E., MACHADO, D.C.C. **Probióticos, experiências com animais gnotobióticos**. In: Ferreira, C.L.L.F. *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*, Viçosa: Suprema, p. 123-133, 2003.

NURNI E., RANTALA, M. **New aspects of *Salmonella* infection in broiler production**. *Nature*, v. 241, p. 210-211, 1973.

OWINGS, W.J., REYNOLDS, D.L., HASIAK, R.J., FERKET., P.R. **Influence of a dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion,**

- carcass characteristics and intestinal microbial colonization.** *Poultry Science*, v. 69, p. 1257–1264, 1990.
- PASCUAL, M., HUGAS, M., BADIOLA, J.I., MONFORT, J.M., GARRIGA., M. ***Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 4981–4986, 1999.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P., BELLON-FONTAINE, M. N. **Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, 1997.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology.** Dublin: Wolfe, 1994, 648p.
- RADA, V., RYCHLY, I. **The effect of *Lactobacillus salivarius* administration on coliforms and enterococci in the crop and ceca of chicken broilers.** *Veterinary Medicin*, (Praha), v. 40, p. 311–315, 1995.
- RABE, L.K., HILLIER, S.I., **Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 7, p. 3260-3264, 2003.
- RADA, V., MAROUNEK, M. **Effect of monensin on the crop microflora of broiler chickens.** *Annales de Zootechnie*, v. 45, n. 3, p. 283-288, 1996.
- REECE, W. O. **Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos.** 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 942p.
- SERVIN AL: **Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, p. 405-440, 2004.
- SCHEINBACH, S. **Probiotics: functionality and commercial status.** *Biotechnology Advances*, v. 16, p. 581–608, 1998.
- SILVA, E.N. **Probióticos e prebióticos na alimentação de aves,** In: *Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*, v. 1, p. 241-251, 2000.

SILVA, E.N., TEIXEIRA, A.S., FIALHO, E.T., BERTECHINI, A.G., SOUZA, P.R.I. **Efeito dos probióticos e antibióticos sobre as vilosidades e pH do trato gastrointestinal de frangos de corte.** *Ciência Agrotécnica*, v. 24, p. 163-173, 2000.

SIMON, O., JADAMUS, A., VAHJEN., W. **Probiotic feed additives effectiveness and expected modes of action.** *Journal of Animal Feed Science*, v. 10, p. 51–67, 2001.

SISSON, S. **Anatomia dos animais domésticos.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, v. 2, p. 1676- 1962, 1986.

SISSONS, J. W. **Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals—a review.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 49, p. 1–13, 1989.

SOUZA, M. R., MOREIRA, J. L., BARBOSA, F. H. F., CERQUEIRA, M. M. O. P., NUNES, A. C., NICOLI, J. R. **Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from Gallus gallus domesticus ceca,** *Veterinary Microbiology*, v. 120, p. 142-150, 2007.

TENOVER F.C., ARBEIT R.D., GOERING R.V., et al. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2233-9, 1995.

TIMMERMAN, H.M., KONING, C.J., MULDER, L., ROMBOOTS, F.M., BEYNEN., A.C. **Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, p. 219–233, 2004.

TIMMERMAN, H.M., MULDER, L., EVERTS, H., VAN ESPEN, D.C., VAN DER WAL, E., KLAASSEN, G., ROUWERS, S.M.G., HARTEMINK, R., ROMBOOTS, F.M., BEYNEN., A.C. **Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics.** *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 2154–2165, 2005.

TIMMERMAN, H.M., VELDMAN, A., VAN DEN ELSEN, E., ROMBOOTS, F.M., BEYNEN, E.A.C. **Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented with Chicken-Specific Probiotics,** *Poultry Science*, v. 85, p. 1383–1388, 2006.

TITZE-DE-ALMEIDA, R, ROLLO FILHO, M, NOGUEIRA, C. A. *et al.* **Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 8, n. 3, p. 197-205, 2004.

THOMKE, S., ELWINGER, K. **Growth promotants in feeding pigs and poultry. III. Alternatives to antibiotic growth promotants.** Animal Zootechnology. (Paris), v. 47, p. 245–271, 1998.

TOLOSA, E.M.C., RODRIGUES, C.J., BEHMER, O.S., FREITAS-NETO, A.S. **Manual de técnicas histológicas para histologia normal e patológica.** 2.ed., Barueri: Manole, 2003, 331p.

TORTUERO, F. **Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal** . Poultry Science, v. 52, p. 197–203, 1973.

TOURNUT, J.R. **Probiotics.** In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu, Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Botucatu: SBZ, 1998, p.179-99.

TRUDY NETHERWOOD, GILBERT, H.J., PARKER, D.S., O'DONNELL, A.G. **Probiotics Shown To Change Bacterial Community Structure in the Avian Gastrointestinal Tract** . Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n. 11., p. 5134–5138, 1999.

USDA United States Department of Agriculture. **Brazil poultry and products**, Semi-annual overview. Acessado em 25 de outubro de 2009. Online.

VAHJEN W, JADAMUS A, SIMON O, **Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults**, Arch Tierernahr, v. 56, n. 6, p. 419-29, 2002.

VAN BELKUM, A. **The role of short sequence repeats in epidemiologic typing.** Current Opinion Microbiology, v. 2, p. 306-311, 1999.

WALKER, D. K., GILLILAND, S. E. **Relationships among bile tolerance, bile salt desconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*.** Journal of Dairy Science, v. 76, p. 956-961, 1993.

WALTER, J., TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., LOACH, D. M., MUNRO, K., ALATOSSAVA, T. **Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers.** Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 1, p. 297-303, 2000.

XAVIER, D. B., BERNAL, F. E. M., TITZE-DE-ALMEIDA, R., **Absence of VanA- and VanB-Containing Enterococci in Poultry Raised on Nonintensive Production Farms in Brazil,** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 4, p. 3072-3073, 2006.

XAVIER, D. B., BERNAL, F. E. M., TITZE-DE-ALMEIDA, R., **Prevalência de enterococos isolados de frangos caipiras em diferentes regiões do Distrito Federal,** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, n. 6, 2008.

ZULKIFI, I., ABDULLAH, N., AZRIN, N.M., HO., Y.W. **Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions.** British Poultry Science, v. 41, p. 593–597, 2000.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimentos recomendados pelo grupo de trabalho da FAO/WHO para avaliação de probióticos para uso em alimentos (FAO/WHO, 2002)

- 1) Identificação da cepa por métodos fenotípicos e genotípicos
 - gênero, espécie, cepa
 - depósito da cepa em coleção internacional de culturas
- 2) Avaliação da segurança de uso:
 - testes in vitro e, in vivo (com animais)
 - fase 1 dos estudos em humanos
- 2.1) Caracterização funcional
 - testes in vitro
 - experimentos com animais
- 3) Fase 2 de experimentos em humanos: duplo-cego, aleatório, controlado por placebo (DCCP) ou outro delineamento apropriado com tamanho da amostra e resultados primários apropriados para determinar se a cepa/produto é eficaz
- 4) Segundo experimento DCCP feito por um grupo de pesquisa independente para confirmar os resultados
- 5) Fase 3, comparação da eficácia dos probióticos e tratamentos convencionais em condições específicas,
- 6) Alimento probiótico
- 6.1) Rotulagem
 - conteúdo: gêneros, espécies e cepas presentes no produto
 - número mínimo de microrganismos viáveis ao final da vida de prateleira
 - condições apropriadas para estocagem
 - serviço de atendimento ao consumidor

Anexo 2. Ilustração Anatomia do Trato Gastrointestinal de *Gallus gallus domesticus*.