

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM
PROBIÓTICO A BASE DE *Bacillus***

Danilo dos Santos Constant

Zootecnista

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM
PROBIÓTICO A BASE DE *Bacillus***

Danilo dos Santos Constant

Orientador: Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2018

C757a	Constant, Danilo dos Santos Avaliação do desempenho zootécnico de frangos de corte suplementados com probiótico a base de Bacillus / Danilo dos Santos Constant. -- Jaboticabal, 2018 53 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Ruben Pablo Schocken Iturrino 1. Probiótico. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

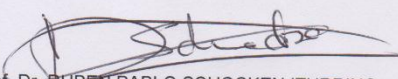
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM FRANGOS DE CORTE
SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO A BASE DE *Bacillus*

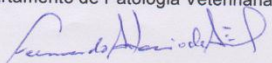
AUTOR: DANILO DOS SANTOS CONSTANT

ORIENTADOR: RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

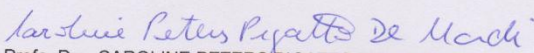
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI
Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP

Jaboticabal, 18 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANILO DOS SANTOS CONSTANT – Nascido em Jaboticabal, SP, aos 11 de Abril de 1988, filho de Maria José Alves dos Santos Constant e Argemiro Carlos Constant, graduado em bacharelado Zootecnia (2015), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal/SP. Foi bolsista de iniciação científica durante 2 anos com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no setor de avicultura da UNESP. Em 2016 ingressou no Programa de Pós-Graduação (MESTRADO) em Microbiologia Agropecuária da mesma instituição.

Dedico esta conquista

À minha família, em especial aos meus pais, que me ensinaram o valor em buscar nossas realizações, nunca desistir perante os obstáculos e sempre respeitar o próximo.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, pela oportunidade em oferecer, dar suporte e poder concretizar mais uma etapa acadêmica.

Ao programa de Microbiologia Agropecuária, referidos professores do programa e amigos que pude fazer durante minha estadia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao prof. Dr. Pablo, que contribuiu para melhorar meu conhecimento, com seus ensinamentos não somente acadêmicos, mas de vida.

Aos amigos da Microbiologia, Lívia, Renan, Roberta, Silvina e Marita em especial por sempre me ajudar nos momentos de dúvida e suporte e também nos momentos de descontração.

E a minha família, por acreditar e contribuir que essa etapa poderia ser finalizada.

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTARCT.....	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Panorama geral da avicultura.....	3
2.2 Probiótico.....	4
2.2.1 Mecanismos de ação dos probióticos.....	5
2.2.1.1 Exclusão competitiva.....	5
2.2.1.2 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas.....	6
2.2.1.3 Competição por nutrientes.....	6
2.2.1.4 Estímulo ao sistema imune.....	7
2.3 Gênero <i>Bacillus</i>	7
2.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.3.2 <i>Bacillus licheniformis</i>	8
2.3.3 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	9
2.4. Efeito dos microrganismos probióticos na alimentação das aves.....	10
3. OBJETIVO.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13

4.1 Local e instalação.....	13
4.2 Condução do experimento.....	13
4.2.1 Vacinação e sistema de luz	14
4.3 Dados para avaliação do desempenho e tratamentos.....	15
4.4 Estatística aplicada.....	16
4.5 Obtenção das amostras.....	17
4.6 Cultivo bacteriano e extração do DNA.....	17
4.7 Detecção das espécies de <i>Bacillus</i>	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Consumo de ração.....	20
5.2 Ganho de peso.....	23
5.3 Conversão alimentar.....	26
5.4 Detecção de <i>Bacillus</i> por PCR.....	28
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA1. Tabela de vacinação de frangos de corte ministrada durante o experimento.....	14
TABELA2. Primers específicos utilizados na diferenciação das espécies de <i>Bacillus</i>	18
TABELA 3. Comparação entre as médias de consumo de ração entre as épocas avaliadas.....	20
TABELA 4. Valores médios do Consumo de Ração Médio dos Lotes, em kg, nos diversos períodos de coleta de dados.....	21
TABELA 5. Comparação entre as médias de ganho de peso entre as épocas avaliadas.....	23
TABELA 6. Valores médios do Ganho de Peso Médio dos Lotes, em kg, nos diversos períodos de coleta de dados.....	24
TABELA 7. Comparação entre as médias de conversão alimentar entre tratamentos.....	26
TABELA 8. Valores médios da Conversão Alimentar Média dos Lotes, em kg, nos diversos períodos de coleta de dados.....	27

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Boxes acomodando os pintainhos, demonstrando os tratamentos (Ração Controle e Probiótico), comedouros e bebedouros *ad libitum*, e instalação.....14
- FIGURA 2.** Pesagens das aves na três fases de avaliação aos 1, 14, 28 e 42 dias para aquisição dos dados e posterior análise dos parâmetro de desempenho.....15
- FIGURA 3.** Linhas 1-16 amostras negativas para *Bacillus amyloliquefaciens* de frangos de corte.CP: Cepa padrão de *B. amyloliquefaciens* correspondente a 430pb. PM:Padrão molecular 100pb DNA Ladder.CN. Controle negativo.....29
- FIGURA 4. A.** Linhas 1-16 amostras negativas para *Bacillus subtilis* de frangos de corte.CP: Cepa padrão de *B. licheniformis* correspondente a 480pb. PM:Padrão molecular 100pb DNA Ladder.CN. Controle negativo. **B.** Linhas 1-16 amostras negativa para *Bacillus subtilis* frangos de corte.CP: Cepa padrão de *B. amyloliquefaciens* correspondente a 520pb. PM:Padrão molecular 100pb DNA Ladder.CN: Controle negativo.....30

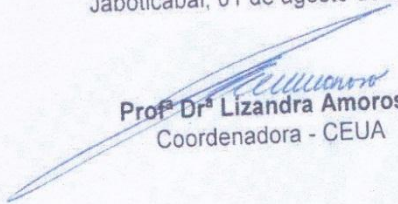
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação do desempenho zootécnico com probiótico produzido pela Agrivalle para frangos de corte**", protocolo nº 11.222/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad-referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP – CÂMPUS DE JABOTICABAL – SP.

Vigência do Projeto	20/08/2016 a 30/09/2016
Espécie / Linhagem	Ave de corte / Cobb500
Nº de animais	202
Peso / Idade	40g / 1 dia
Sexo	Machos
Origem	Granjas comerciais.

Jaboticabal, 01 de agosto de 2016.


Prof. Dr. Lizandra Amoroso
Coordenadora - CEUA

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO A BASE DE *Bacillus*

RESUMO – A utilização de probiótico na alimentação animal como forma de melhorar o seu desenvolvimento e evitando uso de outros aditivos com os promotores de crescimento que deixam substâncias residuais, o uso de microrganismos vivos benéficos a saúde tem se mostrado promissor na pecuária. Atualmente esse tipo de aditivo é de grande importância para a medicina veterinária e zootecnia melhorando os parâmetros de desempenho animal. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os índices de desempenho em frangos de corte suplementados com probiótico na ração, em três diferentes fases de criação com um produto industrial composto por microrganismos do gênero *Bacillus*. O probiótico utilizado é constituído de 10^9 UFC/g de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* e 10^6 UFC/g de *Bacillus amyloliquefaciens*. Foram utilizados 202 pintos de um dia da linhagem Cobb500 durante 42 dias, com 2 tratamentos e 8 repetições cada, para cada fase (inicial, crescimento, terminação). Foi fornecida alimentação conforme exigência nutricional. Realizou-se a pesagem das aves, das trocas de ração e das sobras, com os dados, foi determinada a estatística dos índices de desempenho, conversão alimentar, consumo de ração e ganho de peso. Nas três fases avaliadas do desenvolvimento das aves, houve diferença no consumo de ração de forma positiva com 5,67% de redução por parte dos grupos com probiótico em todas as fases. O ganho de peso também foi satisfatório, com aumento de 4,10%, o mesmo aconteceu para a conversão alimentar com 9,92%. Conclui-se que experimentalmente, a utilização deste probiótico foi benéfico para as aves favorecendo em ganhos em todos os índices avaliados e em todas as fases.

Palavras-chave: frango de corte, probiótico, *Bacillus*

EVALUATION OF ZOOTECHNICAL PERFORMANCE IN BIRD, SUPPLEMENTED WITH PROBIOTICS BASED ON *Bacillus*

ABSTRACT - The use of probiotic in animal feed as a way to improve its development and avoiding the use of other additives with growth promoters that leave residual substances, thus the use of health-promoting live microorganisms is on the rise in livestock. Currently this type of additive is of great importance for veterinary medicine and animal husbandry improving the parameters of animal performance. The objective of this research was to evaluate performance indices in broilers supplemented with probiotic in ration, in three different breeding phases with an industrial product composed of microorganisms of the genus *Bacillus*. The probiotic consists of 10^9 UFC/g of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* and 10^6 UFC/g *Bacillus amyloliquefaciens*. A total of 202 1 day Cobb500 chicklets were used for 42 days, with 2 treatments and 8 replicates each, for each stage (initial, growth, termination). Food was supplied according to nutritional requirement. Weighed the birds, feed exchanges and leftovers with the data, we determined the statistics of performance indices, feed conversion, feed intake and weight gain. In the three evaluated phases of the development of the birds, there was a difference in feed intake positively with 5.67% reduction by the groups with probiotic in all phases. The weight gain was also satisfactory, with an increase of 4.10%, the same happened for the feed conversion with 9.92%. It was concluded that, experimentally, the use of this probiotic was beneficial for birds favoring gains in all ratios evaluated and in all phases.

Key words: broiler chicken, probiotic, *Bacillus*

1. INTRODUÇÃO

A avicultura no âmbito mundial destaca-se como uma atividade de grande importância econômica e social, no Brasil não é diferente, essa atividade tem grande destaque em produção e exportação de carne, além dos produtos derivados.

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, os investimentos na avicultura brasileira contribuem para que sempre tenham aumento na produção a cada ano. Nosso país produziu ano passado 13 milhões de toneladas de carne, com 33% da produção destinados à exportação, é o maior exportador a vários anos e tem os estados do Sul e Sudeste como principais investidores e produtores representando mais de 50% da produção brasileira (ABPA, 2018).

A produção nacional de carne de frango entre 2016 a 2017 alcançou 1,7% de aumento e a queda na exportação foi de 0,01%. É uma proteína muito consumida e acessível economicamente, seu consumo per capita foi de 44,8 Kg (EMBRAPA, 2018).

Os dados supracitados indicam como essa atividade possui caráter amplo e competitivo, com muitas empresas realizando investimentos em tecnologia e nutrição, mantendo em destaque a avicultura em produção e exportação. Além deste fato, o custo econômico da produção brasileira é menor frente a países como Estados Unidos e China, já que possuímos grande área agricultável de grãos (COLONI, 2011).

Diante deste cenário rentável e promissor que a avicultura vem demonstrando, os produtores e indústrias do setor, estão sempre atentos em cuidados com manejo, nutrição e novas alternativas na substituição dos promotores de crescimento. Dentre estas, a utilização de probióticos a base de *Bacillus*, tem demonstrado melhorar o desenvolvimento animal, principalmente na produção avícola com vantagens extras para o desempenho das granjas.

Diante dos vários probióticos disponíveis no mercado e até os mais novos, está sendo muito estudado diversas estirpes do gênero *Bacillus*, o qual compreende um grande número de espécies.

Os *Bacillus* são amplamente distribuídos no ambiente e poucas espécies são patogênicas. São bastonetes Gram positivos, formadores de esporos, obrigatoriamente ou facultativamente aeróbios, de catalase positiva e sintetizadores de muitas enzimas. Na literatura, além de frangos de corte (KONIECZKA et al., 2018; WANG et al., 2018; CHENG et al., 2018; HEAK et al., 2018), o uso desses probióticos também são estudados em ratos (URDACI et al., 2018), seres humanos da área de esportes (TOWSED et al., 2018), galinhas poedeiras indígenas (SUGIHARTO et al., 2018), peixes como a truta arco-íris (DESHAD et al., 2018), indústria de alimentos (KONUARY & ERGINKAYA., 2018), suínos (YANG et al., 2018), plantas e no controle biológico de pragas agrícolas.

CAO & ZHAN (2018) encontraram índices positivos em frangos de corte submetidos a dieta com probiótico constituído de *B.amyloliquefaciens*. Além disso, esses autores e outros citados anteriormente também encontraram resultados experimentais satisfatórios com utilização de probióticos, seja no desempenho das aves, diversidade da microbiota, melhoras na imunidade, inibição de patógenos, disponibilidade enzimática, melhora na digestibilidade de alimentos.

Com isso a questão de inserção de microrganismos favoráveis ao desempenho animal é de grande importância tanto para os pecuaristas garantirem os lucros e retorno dos investimentos, melhorar a produção animal, diminuir uso de produtos invasivos ao animal ou da carne comercial. Considera-se de suma importância melhorar o desenvolvimento de frangos de corte para a geração de alimento, com alternativas a fim de favorecer a nutrição e minimizar o uso indiscriminado de antimicrobianos, zelando pela segurança alimentar e comercialização da carne avícola.

Baseado nessas informações idealizou-se o presente trabalho, com a finalidade de testar um probiótico comercial constituído por três espécies de *Bacillus* e verificar sua eficiência, que obtendo um bom resultado seu uso possa ser disponibilizado à comunidade pecuarista do ramo. Além de divulgar a comunidade científica sobre a importância da utilização de microrganismos na nutrição animal e incentivar a novas pesquisas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama geral da avicultura

No início da metade do século XX, a avicultura brasileira passou por uma série de modernizações, principalmente nos setores de genética, manejo e nutrição, transformando-se em uma atividade altamente produtiva (TINOCO, 2001). O frango se destacou ao público consumidor fundamentalmente de classe média, ingressando assim, no consumo popular com o decorrer do tempo (TAVARES & RIBEIRO, 2007).

Em 2015, o consumo per capita foi de 43,25Kg/ano (ABPA 2016). O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, devido ao alto nível tecnológico alcançado pelo setor, colocando a avicultura como uma atividade privilegiada em relação a outras atividades pecuárias no país. (KWABATA, 2008).

Uma das melhorias no quesito nutrição foi com relação a conversão alimentar de frangos que melhorou em 65% e redução no consumo de ração de até 50%. Outro avanço em sistemas intensivos foi o rápido ganho de peso (mais de 50g/dia), influenciando na redução da idade ao abate que na década de 20 era de 12 semanas, atualmente este tempo caiu para 6 semanas (FABRI & CHÁCON, 2018). Diversas pesquisas sobre nutrição avícola, buscam maior eficiência e economia, já que o gasto com alimentação eleva os custos da produção animal (STRADA, 2005).

Devido a associação do uso de promotores de crescimento com a indução de resistência cruzada por bactérias patogênicas e com reações de hipersensibilidade ou câncer, devido à presença de seus resíduos na carne, em janeiro de 2006, a União Europeia, responsável por parcela significativa das exportações brasileiras de frango, banuiu a utilização de antibióticos da alimentação de aves, permitindo somente o emprego dos ionóforos monensina sódica e salinomicina como agentes anticoccidianos (MENTEN, 2002., COUNCIL, 2003).

Frente a estas perspectivas, produtos como os probióticos são elaborados e inseridos na alimentação para otimizar a produção do frango de corte, melhorando os parâmetros zootécnicos, como conversão alimentar, ganho de peso e consumo de ração.

2.2. Probiótico

O desenvolvimento de produtos considerados saudáveis está cada vez mais desafiador tanto na área humana como na pecuária. Determinados tipos de substâncias são conhecidas pelos seus efeitos benéficos à saúde, como produtos biorreguladores. Estes tipos de produtos contribuem com a nutrição, possuem substâncias biologicamente ativas que melhoram a saúde e a produtividade (KOMATSU et al., 2008).

Os probióticos compreendem um exemplo destes alimentos promotores da vida. Stanton et al. (2005) e Roberfroid (2005), definem o probiótico como substâncias que afetam de forma benéfica as funções do trato intestinal, garantem melhores efeitos nutricionais e reduzem os riscos de doenças. São microrganismos vivos que em alta concentração favorecem o equilíbrio microbiológico intestinal gerando efeitos positivos à saúde (SALMIEN et al., 1999; DUPONT., 2001; ISOULARI.,2001; REID et al., 2001;BRASIL., 2002, SANDERS., 2003; BADARÓ et al., 2008). Fuller (1989), ressalta que o probiótico é um suplemento aditivo de rações, composto por agente microbiano vivo, com atuação benéfica no hospedeiro, melhorando o equilíbrio no intestino.

O probiótico se baseia no princípio da simbiose, onde há associação de organismos superiores com microbiota intestinal, proporcionando benefícios recíprocos. Isto ocorre porque as bactérias probióticas diminuem as chances de sobrevivência das bactérias patogênicas, melhoram a modulação da microbiota intestinal (FATEC, 1997).

Dentre os microrganismos usados como promotores, os do gênero *Bacillus* é um dos mais utilizados e efetivos na alimentação de aves de corte, melhorando seu

desenvolvimento. A ação dos probióticos pode ocorrer de várias formas, através de mecanismos físicos, biológicos, bioquímicos (SILVA & PINHEIRO, 2008).

2.2.1. Mecanismos de ação dos probióticos

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão totalmente elucidados. Porém, especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal. Um dos mecanismos de ação dos probióticos parece ser através de uma competição física no trato digestivo, competindo com os patógenos na ocupação dos sítios de aderência nas vilosidades intestinais, impedindo a fixação dos mesmos, protegendo as vilosidades e a superfície absorptiva de toxinas outra atividade seria produção de substâncias antibacterianas e enzimas, competição por nutrientes e estímulo ao sistema imune (SILVA & PINHEIRO, 2008).

2.2.1.1 Exclusão competitiva

As bactérias probióticas ocupam os sítios de ligação na mucosa intestinal formando uma barreira física. O mecanismo físico pode ser definido pela competição por exclusão (ALVES et al, 2017), onde a microbiota normal fica em equilíbrio no trato gastrointestinal atuando como uma barreira defensiva do animal, aderida às vilosidades intestinais e impedindo a fixação dos patógenos (BIOTECNAL, s.d).

A colonização varia com o tipo de bactéria e com o tipo de hospedeiro. Algumas bactérias somente se aderem à superfície superior (glicocalix) dos enterócitos, enquanto que outras residem somente nas criptas onde são produzidas as novas células epiteliais que migram até as vilosidades (CUNHA, 2013).

Além do efeito físico de barreira contra bactérias patogênicas, as bactérias probióticas também exercem um efeito biológico, na medida em que promovem um ambiente de baixa tensão de oxigênio, desfavorecendo o crescimento de bactérias enteropatogênicas. Contribuem também com um efeito químico, com a produção de ácidos orgânicos como láctico e propiônico, os quais levam a uma redução do pH do ambiente intestinal, inibindo alguns patógenos (SILVA & PINHEIRO, 2008).

2.2.1.2 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas

As bactérias probióticas podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio, que têm ação antibacteriana. As bacteriocinas são substâncias protéicas e antibióticas de ação local e que tem ausência de letalidade para as células produtoras (CUNHA, 2013). Estas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias gram-negativas quanto para gram-positivas.

A síntese de substâncias inibitórias à agentes externos, se caracteriza como um mecanismo químico e bioquímico com produção de ácido láctico, reduzindo o pH intestinal tornando o meio impróprio para a multiplicação de patógenos (FULLER, 1989), diminuindo e prevenindo a síntese de amônia tóxica, fenol e outras substâncias prejudiciais à saúde animal, ocasionando maior assimilação de nutrientes (BIOTECNAL, s.d). Os probióticos, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro, além de substâncias que o hospedeiro não consegue digerir (prébióticos). Produzem também outros ácidos orgânicos, como o propiônico, o acético e butírico. As bactérias probióticas ainda podem produzir substâncias com capacidade de neutralizar enterotoxinas, as quais são produzidas por bactérias patogênicas (SILVA & PINHEIRO, 2008).

2.2.1.3 Competição por nutrientes

A competição por nutrientes ocorre entre o animal e a bactéria. Porém, essa competição também ocorre entre as bactérias intestinais por seus nutrientes específicos (RIBAS, 2014). As bactérias probióticas se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas enzimas digestivas, ou substâncias que foram intencionalmente adicionados à dieta como prebióticos.

2.2.1.4 Estímulo ao sistema imune

As bactérias probióticas têm a capacidade de modulação de respostas imunes sistêmicas aumentando o número e a atividade de células fagocíticas do hospedeiro.

Alguns gêneros de bactérias intestinais estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos. Entretanto, o verdadeiro mecanismo, pelos quais essas bactérias estimulam o sistema imune, ainda, permanece com muitos pontos a serem esclarecidos (POURABEDIN & ZHAO, 2015). O trato intestinal das aves é o órgão de maior responsabilidade no desenvolvimento da imunidade geral inespecífica.

O estímulo da imunidade, pelo aumento do número de linfócitos T e B (MWANGI et al, 2010), produção de anticorpos e atividade fagocitária com ativação dos macrófagos contra agentes indesejados é caracterizado como mecanismo biológico de defesa (SAAD, 2006). Yin et al, (2010) afirma que estudos demonstram que as bactérias probióticas contêm alguns antígenos atuantes contra microrganismos patogênicos, imunizando o hospedeiro.

2.3. Gênero *Bacillus*

São bastonetes Gram-positivos, geralmente móveis, aeróbios ou facultativos, apresentam endosporos centrais quando expostos a ambientes extremos de temperatura e acidez, são de catalase positiva. A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, e pH =7,0 próximo a neutralidade (FILHO et al, 2010).

Na natureza podem ser encontrados na água, ar, solo, e algumas espécies são naturais da microbiota humana e animal. Apenas dois de seus representantes são considerados patogênicos ao ser humano e animais, algumas estirpes de *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*, os demais, são saprófitos (PAZ, 2005).

Os representantes do gênero *Bacillus* apresentam características fisiológicas abrangentes, pois há espécies de caráter mesofílico, termofílico facultativos, ou obrigatório e termófilos extremos, psicrófilos, acidófilos, halófilos, ou seja, organismos capazes de crescer em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (FILHO et al, 2010). Sua parede celular é composta por um polipeptídeo constituído pelo ácido D-glutâmico, que apresenta características antifagocitárias.

Fermentam açúcares como glicose, maltose, sacarose e raramente a lactose, também podem secretar enzimas proteolíticas, alguns produzem hemolisinas e

podem reduzir o nitrato (PAZ, 2005). Se desenvolvem em meios que contenham açúcares, ácidos orgânicos e álcoois como fonte de carbono e amônia como fonte de nitrogênio, além de terem a capacidade de utilizar os produtos de degradação como fonte de energia (TORTORA et al. 2003).

2.3.1. *Bacillus subtilis*

Espécie de *Bacillus* que produz substâncias com ação antimicrobiana, inclusive antibióticos, o que possibilita a utilização destes no controle biológico de patógenos. De acordo com Todovora & Kozhuharova (2009) e Basso et al.(2012), a espécie *B. subtilis* é uma das mais importantes produtoras de metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana.

Devido esta possibilidade de degradação de metabolitos e seu aproveitamento, seu potencial como probiótico é vantajoso nos estudos e pesquisas na alimentação de frangos. Pois, podem degradar alimentos disponibilizando ainda mais nutrientes que não seria possível somente pelo trato intestinal da ave, assim, consequentemente saciaria mais rapidamente, consumindo menos ração, melhorando o índice de conversão alimentar.

Faria (2009) afirma em estudos feitos por ele utilizando *B.subtilis* e *Lactobacillus* sp em aves suplementadas com o aditivo, apresentaram menor índice de mortalidade na fase de 1 a 42 dias comparado ao grupo que não recebeu os microrganismos.

2.3.2. *Bacillus licheniformis*

É uma bactéria facilmente encontrada no solo, mesofílica, pode ser encontrada em penas de aves especificamente terrestres. Sua temperatura ideal para secreção enzimática é de 37°C (BUENO, 2008). A alta capacidade de secreção da serina protease alcalina tornou a *B. licheniformis* uma das bactérias mais importantes na produção de enzimas industriais e usada como uma protease detergente biológica (GIONGO, 2006). A vantagem deste microrganismo, a torna um importante agente probiótico na nutrição de aves, devido sua alta capacidade de degradar proteases,

pode quebrar nutrientes protéicos mais complexos em mais simples, resultando em maior disponibilidade de aminoácidos, facilitando o trabalho do trato digestório e perdendo menos energia na digestão (GIONGO, 2006).

Lin et al (2017) testaram *B. licheniformis* como probiótico em galinhas, desafiadas com *Clostridium perfringens*, e comprovaram que sua ação sobre os grupos acometidos pelo patógeno ficaram mais restritos. Foi demonstrado ausência de sinais de animais doentes, fortalecendo os estudos com *B.licheniformis*, ajudando na exclusão competitiva do patógeno.

A suplementação dietética de *B.licheniformis* elevou a altura de vilosidades intestinais de galinhas poedeiras, melhorou desempenho na postura e saúde intestinal em experimentos realizados, além de elevar a altura das vilosidades intestinais melhorando a área de absorção de nutrientes, evitou a aderência de agentes patogênicos, ao revestirem internamente o intestino como uma camada (LEI et al. 2013). Demais estudos indicam que também favorecem à regeneração de áreas inflamadas ou lesionadas como ação cicatrizante.

2.3.3. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens também é encontrado no solo, telúricos, que sintetiza uma proteína antibiótica, um tipo de ribonuclease e algumas bacteriocinas muito estudada na pesquisa científica (SCHULTZ et al, 2005).

Pela sua capacidade de síntese protéica e degradação de macronutrientes, é um microrganismo muito usado, pesquisando a sua inserção como probiótico na nutrição animal, destacando vantagens na produção e retornos econômicos ao produtor.

É utilizado como aditivo probiótico gerando vantagens de produção animal, melhorando o desempenho dos frangos de corte e até para galinhas de postura, com suas vantagens no trato intestinal anteriormente mencionadas.

Supriyat et al (2015) constataram que ao utilizar *B. amyloliquefaciens* na alimentação de frango de corte com farelo de arroz fermentado, houve melhora de

resultados para ganho de peso e conversão alimentar. O teor de nutrientes do farelo de arroz fermentado melhorou o desempenho, indicando sua inclusão em até 15% da alimentação animal. Com base nas informações citadas, o *B. amyloliquefaciens* poderia ser sugerido como aditivo alimentar para frangos, tendo em vista que ele melhorou significativamente o ganho de peso ao longo dos 35 dias de pesquisa com inserção de 20g/Kg de ração (AHMED et al, 2014).

Aves de produção foram alimentadas com inclusão de soja fermentada composta por *B. amyloliquefaciens*, houve melhora no aumento de ganho de peso e conversão alimentar comparado ao controle (CHISTIAKOV et al, 2015). Resultados estes, que demonstram a eficácia em administrar aditivos constituídos por microrganismos vivos benéficos a saúde intestinal, conferindo resultados de avanço no desempenho animal, desenvolvimento da produção avícola.

2.4. Efeito dos microrganismos probióticos na alimentação das aves

Henry et al., (1987), Izat et al. (1989), indicaram que a utilização de promotores de crescimento proporcionaram reduções no número de bactérias patogênicas aderidas à mucosa intestinal, reduzindo a produção de toxinas e amônia.

Maruta (1993), observou a inibição de microrganismos nocivos nas fezes de poedeiras, ocasionada pela suplementação de *Bacillus subtilis*, ocorrendo diminuição de *E. coli*, *Clostridium perfringens* e redução dos níveis de amônia. Esta inibição na síntese amoniacal resulta na redução da concentração da substância no interior do aviário, promovendo uma diminuição das enfermidades e consequente melhoria da produtividade.

Alvarez et al. (1994) usando *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento e enzimas (amilase, proteases, celulasas), constataram a superioridade da ação probiótica em relação ao ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte. Estes resultados também foram obtidos por Hamid et al. (1994) em frangos de corte com 35 dias de idade.

Os efeitos benéficos dos aditivos probióticos são notórios. E estudos estudos são necessários, pois a busca em achar melhores probióticos e espécies utilizadas é constante, sempre relacionado à uma nutrição de boa qualidade garantindo a saúde animal.

Estudos referentes a busca de novos microrganismos e espécies são fundamentais para a constante melhoria da avicultura brasileira.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar o desempenho de frangos de corte suplementados com probiótico composto por *Bacillus*.

Objetivo específico

- Averiguar índices zootécnicos: ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e consumo de ração (CR).

- Verificar a mortalidade nos três períodos de criação

- Confirmar a efetividade do produto

- Detectar a presença dos *Bacillus* após transito nos sistema digestório das aves

- Confirmar a concentração dos *Bacillus* indicados no probiótico com a contagem

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local e instalação

O ensaio foi realizado no galpão da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Campus de Jaboticabal/SP, do Departamento de Patologia Veterinária. Com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV, sob protocolo nº11222/16. A instalação é composta por 16 boxes de 3,84m²/cada (2,40m x 2,60m), cada box representa uma unidade experimental, composta por piso de concreto, 2 ventiladores suspensos e cortinas de carretilha. Antes do início do experimento a área foi devidamente higienizada, lavada com sabão e detergente DeterBio (amônio quaternário), em seguida foi espalhado solução de Cloro a 2% para maximizar a limpeza, e após a secagem foi feita uma camada com cal hidratada Ca(OH)² no piso de cada boxe, servindo como um agente antimicrobiano.

4.2 Condução do experimento

Foram utilizados 202 pintainhos de corte, da linhagem comercial Cobb500, machos e fêmeas com um dia de idade e peso médio inicial de 40g, 10 aves foram destinadas como reserva, alojados em boxes com piso de concreto e cama de maravalha. Cada parcela experimental (box) estava equipada com comedouros tubulares e bebedouros pendulares. Para aquecimento nos primeiros dias de idade utilizou campânulas elétricas com lâmpadas infravermelho de 150Watts (Figura 1). O período total de criação das aves foi de 42 dias, dividido em três subperíodos de avaliação, 1 a 14, de 15 a 28 e de 29 a 42 dias.

Figura 1: Boxes com maravalha acomodando 12 pintainhos, demonstrando os tratamentos (Ração Controle e Probiótico), comedouros e bebedouros *ad libitum*, e campânulas de aquecimento para controle de temperatura.



4.2.1 Vacinação, sistema de luz e mensuração de umidade e temperatura

As aves foram vacinadas contra as doenças de Gumboro, New Castle e Bouba, conforme o calendário de vacinação adotados para frangos de corte, que consta na Tabela 1.

Tabela 1. Calendário de vacinação para frangos de corte

Doença	Idade das aves	Via de administração
Marek	1 dia	Subcutânea
Gumboro	7 dias	Água
New Castle	7 dias	Água
	14 dias	
Bouba	21 dias	Membrana da asa

Os pintainhos de 1 dia foram pesados e colocados dentro de cada box, 12 aves cada box, de modo que fossem agrupados de forma homogênea, conforme o seu peso para manter uniformidade dos lotes. As vacinas foram administradas na água de bebida e também na membrana da asa segundo indicação do fabricante. Os

pintainhos de um dia vieram previamente vacinados do incubatório contra a doença de Marek. As médias da temperatura mínima e máxima e umidade foram registradas, monitoradas periodicamente, durante o período de criação das aves. O programa de luz adotado foi de cinco horas de descanso (luz natural + luz artificial), com ração e água fornecidos à vontade no período de 42 dias.

4.3 Dados para avaliação do desempenho e tratamentos

A avaliação do desempenho zootécnico dos frangos de corte foi realizada em três períodos: fase inicial (1-14 dias), fase de crescimento (15-28 dias) e fase de terminação (29-42 dias). As pesagens das aves e da ração foram realizadas na chegada dos animais (1º dia), e aos 14, 28 e 42 dias (Figura 2). Com os dados das pesagens, calculou-se o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, e além desses dados, a porcentagem de mortalidade também foi aferida admitindo máximo de 5%. As avaliações de cada fase foram realizadas afim de determinar o efeito do probiótico nas diferentes fases de criação, dessa forma avaliar em qual fase o probiótico teve melhor performance ou se foi eficiente por todo o período.

Figura 2: Pesagens das aves aos 1, 14, 28 e 42 dias



Figura 2.1: Pesagem na chegada das aves (1º dia de vida)



Figura 2.2: Plataforma de Pesagem das aves aos 14, 28 e 42 dias de idade

Para este trabalho foi utilizado um delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) com parcelas subdivididas no tempo. Foram realizados dois tratamentos: T1 (controle) e T2 (ração com probiótico Agrivalle) em três períodos: fase inicial (1 a 14 dias) fase de crescimento (15 a 28 dias) e fase de terminação (29 a 42

dias) com 8 repetições de 12 aves cada, totalizando 96 aves para cada tratamento.

A quantidade do produto incorporada na ração foi de 0,1% seguindo indicações do fabricante. A composição e concentração do produto é de *Bacillus subtilis* 10^9 UFC/g, *Bacillus licheniformis* 10^9 UFC/g, *Bacillus amyloliquefaciens* 10^6 UFC/g e MOS 350g/KG (mananoligossacarídeos) e aminoácidos 30g/Kg. Também foi realizado a diluição e contagem para comprovar a concentração do produto, realizando a diluição em dez tubos de ensaio com 9ml de solução salina cada e identificados de 10^{-1} a 10^{-10} , foi adicionado 1ml de meio de cultivo no primeiro tubo e agitado em vortex para homogeneizar e deste coletado 1 ml e passado para próximo tubo e assim sucessivamente até ultimo tubo. Depois seguindo a sequência 1ml de cada tubo diluído foi colocado em placas de petri também identificadas em duplicata e adicionado meio Ágar BHI, realizado a técnica de Pour Plate para misturar e uniformizar, depois levado para estufa a 37°C por 24 horas, assim realizou a contagem e obteve a concentração de $4,7 \cdot 10^9$ UFC/ml, obedecendo a concentração indicada do produto.

As rações utilizadas ao longo dos 42 dias de experimento foram fabricadas sem a adição de promotores de crescimento, para poder avaliar o real efeito do probiótico na fábrica de ração da FCAV/ UNESP, e foram utilizadas três formulações de ração, uma para cada fase: Ração 1 – fase inicial, Ração 2 – fase de crescimento e Ração 3 – fase de terminação seguindo exigências nutricionais.

4.4 Estatística

A estatística do projeto foi avaliada em parcelas subdivididas por um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos, sendo: a) tratamento sem adição de probiótico na ração; b) com adição do probiótico na ração, em três períodos (1 a 14 dias; 14 a 28 dias; 28 a 42 dias) com 8 repetições de 12 aves cada, considerando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o programa AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos, versão 1.0, 2010 (BARBOSA e MALDONADO JR, 2010).

4.5 Obtenção das amostras

Foram realizados colheitas de excreções de frangos para estudo microbiológico, sendo um frango por box nos dias de cada pesagem e troca de ração (1,14,28,42).

As amostragens foram efetuadas com auxílio de suabes estéreis, totalizando 64 amostras de frangos de corte do experimento. As amostras foram colhidas diretamente da cloaca de cada ave, sendo estes alocados individualmente em tubos contendo 5,0 mL de BHI (Brain Heart Infusion Broth), armazenados em caixa térmica e levados para o Laboratório de Bactérias Anaeróbias, no Prédio da Microbiologia, pertencente ao Departamento de Patologia Veterinária da UNESP Jaboticabal.

4.6 Cultivo bacteriano e extração de DNA

Os suabes contendo amostras do conteúdo cloacal dos tubos foram colocados em estufa a 37°C por 24 horas para crescimento de cultivo. Após o crescimento, foi coletado uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra e armazenados em microtubos de 2,0 mL com 1,0 mL de meio e Glicerol a 20% para evitar lise celular, em seguida armazenados em freezer a -80°C para posterior análise de detecção por PCR. Para especificação dos primers, a análise molecular foi através do gene 16s rRNA. de *Bacillus*. As cepas controle positivo foram adquiridas da instituição Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Para análise do DNA, os cultivos armazenados foram ressuspensos, utilizando tubos com 5,0 mL de BHI estéreis e inoculando uma alíquota de 0,2 mL de cada amostra do cultivo previamente armazenado, e incubados em estufa a 37° por 24 horas para obter cultivo e amostra para realizar extração de DNA.

As extrações de DNA foram realizadas inicialmente por lise térmica (OLSVIK & STROCKBINE, 1993). Assim, 1,0 mL do cultivo bacteriano foi transferido para microtubos de 2,0 mL. Os microtubos foram centrifugados 5 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e ao pellet de células formado foi acrescido de 1,0 mL de solução PBS (8mM

NaHPO₄.12H₂O; 1,76mM KH₂PO₄; 137mM NaCl; 2,7mM KCL). O pellet foi dissolvido em vortex e, logo em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e ao pellet de células acrescentado 0,2 mL de água Milli-Q estéril e novamente ressuspenso.

A extração de DNA foi realizada colocando os microtubos em equipamento Thermomixer Compact com temperatura de 99°C, por 10 minutos para extração de DNA. Após a lise térmica das células, as amostras foram submetidas à centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente para separação dos fragmentos celulares do material genético. Assim, logo após, 0,2mL do sobrenadante, contendo o DNA, foram transferidos para tubos novos e armazenados em freezer.

4.7 Detecção das espécies de *Bacillus*

Para a detecção das espécies de *Bacillus* do probiótico, foram utilizados os primers descritos. (Tabela 2).

Tabela 2. Primers específicos utilizados na diferenciação das espécies de *Bacillus*, segundo Jeyaran et al. (2011).

Primers	Sequências	Tamanho(pb)
<i>B.subtilis</i>	CAAGTACCGTTTCG CGGTACCTTGATG	480
<i>B.amyloliquefaciens</i>	GGCGACTCTCTGCC GGCGACTCTCTGG	430
<i>B.licheniformis</i>	GAGGCGCGAATCCG GAGGCGCGAATCTAG	520

Para a reação de amplificação dos fragmentos(DNA), utilizou-se o tampão 1X [100 mM Tris-HCL pH 8,8; 500mM KCL; 0,8%(v/v) Nonidet P40]; MgCl₂ mM; dNTP's 0,2 mM, 0,5 U de Taq DNA Polimerase, 5pmol de primer, 2µL de DNA genômico e água pura estéril.

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti Thermal Cycler programado da seguinte forma: 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 40 segundos a 55°C e 1minuto a 72°C, finalizando com um ciclo a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%(p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de tamanho molecular 100pb DNA Ladder. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento GEL DOC XR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), ganho de peso médio (kg) são índices zootécnicos essenciais na rotina da avicultura, e nesta pesquisa demonstraram resultados benéficos para a avaliação do probiótico Agrivalle, demonstrando que houve diferenças entre os tratamentos T1 (ração comercial) e o T2 (ração comercial com probiótico), sendo que T2 apresentou melhor desempenho que o T1.

O índice de mortalidade foi aferido e a porcentagem ficou dentro do aceitável de no máximo 5% do total de aves, sendo que 6 aves morreram ficando na média de 3% de mortalidade do total do lote.

5.1 Consumo de ração

Os dados desta pesquisa foram submetidos as análises estatística, utilizando regressão polinomial com efeito entre os tratamentos e ajustados pela regressão quadrática, o consumo de ração não mostrou diferença significativa entre os dois tratamentos, sugerindo que estatisticamente os efeitos foram iguais. Porém numericamente, estes resultados foram mais favoráveis ao tratamento com o aditivo.

Mas, quando os parâmetros se apoiam nas médias entre as fases avaliadas, seguindo o mesmo modelo estatístico citado acima, a estatística apresenta diferença significativa entre as fases (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação entre as médias de consumo de ração entre as fases avaliadas

Teste de Tukey		
Época	CR	
42	22,930438	a
28	15,342375	b
14	4,5707500	c
DMS(5%) = 0,8653		

Analisando o parâmetro de consumo de ração, em todas as fases os resultados foram melhores com utilização do probiótico. A média entre os tratamentos na primeira fase (01 a 14 dias) foi de 4,697kg para o T1 e de 4,445kg para o T2, representando que o tratamento com probiótico consumiu 5,67% a menos de ração, resultado este, que representou maior eficiência na fase inicial.

Na segunda fase (15 a 28 dias) o consumo demonstrou que o tratamento com probiótico consumiu 1,95% a menos de ração, seguida da terceira fase (29 a 42 dias) com 3,29% a menos no consumo, como observado na tabela 4.

Tabela 4. Valores médios do Consumo de Ração Médio dos Lotes, em kg, nos diversos períodos de coleta de dados.

	Consumo Médio de Ração Lotes (kg)		consumo de ração (%)
	Tratamento 1*	Tratamento 2**	
01 a 14 dias	4,697 ^c	4,445 ^c	5,67%
15 a 28 dias	15,490 ^b	15,195 ^b	1,95%
29 a 42 dias	23,301 ^a	22,560 ^a	3,29%
01 a 42 dias	43,488 ^c	42,199 ^c	3,06%

* Tratamento 1 – ração comercial; ** Tratamento 2 – ração comercial com adição do probiótico. Letras semelhantes os valores não diferem estatisticamente, letras diferentes os valores diferem estatisticamente

Correa et al (2003), encontraram resultados semelhantes ao deste trabalho, estudando frangos de corte submetidos com alimentação adicionada por *B.subtilis*, que apresentou menor consumo de ração na fase inicial de 1 a 20 dias, com 6,03% de redução, valor superior ao do nosso trabalho de 5,67%.

Utilizando *B.licheniformis* Liu et al. (2012) demonstraram um aumento significativo no ganho de peso, redução do consumo de alimento e melhora no índice de conversão alimentar de frangos de corte na terceira semana de criação.

Um estudo realizado por Maiorka et al. (2001), que avaliou o desempenho zootécnico de frangos de cortes alimentados com rações adicionadas um composto prebiótico (parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*), um probiótico a base de *Bacillus subtilis* e outra com a associação de ambos (simbiótico), relataram uma ligeira diminuição no consumo de ração do grupo com probiótico quando comparados aos demais tratamentos.

Relatos de Lei et al (2015), em testes com frangos de corte alimentados com ração adicionada de virgiamicina, dois níveis de probiótico um com 30 mg/Kg ração e outro com 60 mg/Kg ração de *B. amyloliquefaciens* durante 21 dias, resultou em maior ganho de peso e menor consumo de ração com percentual de 3,55% com o aditivo comparado ao grupo controle, sendo o valor inferior que o nosso resultado na primeira fase até 14 dias que foi de 5,67% e superior a segunda fase de 15 a 28 dias com 1,95%.

Achados opostos ao deste trabalho, afirmam que uso de probiótico formado por *B.subtilis* e *Lactobacillus acidophillus* não favoreceram em nenhum dos parâmetros avaliados de desempenho, com resultados similares ao controle (SOUZA et al. 2010). Na fase de 1 a 7 dias de idade o consumo de alimento não foi influenciado pela interação com níveis de probiótico, mas não é descartado sua utilização na fase inicial, pois beneficiam o hospedeiro melhorando equilíbrio microbiano e por apresentar ação de imunomodulação (APPELT et al, 2010).

Os probióticos não afetam positivamente somente o desempenho fisiológico e nutricional, mas também o equilíbrio da microbiota normal ou contaminante do hospedeiro. Xu et al. (2018), comprovaram que frangos de corte alimentados com probiótico com *B.licheniformis* tiveram um efeito positivo na região ileal contra o *Clostridium perfringens* na contaminação induzida e redução no consumo de alimento.

O consumo de ração é um fator crucial no desempenho de aves, pois a partir dele e o indicador de ganho de peso é verificado o coeficiente de conversão, além de contribuir economicamente ao produtor, pois com a redução no consumo consequentemente reduz o investimento com ração.

5.2 Ganho de peso

Os dados encontrados desta pesquisa para o ganho de peso das aves também foram submetidos as análises estatísticas, utilizando regressão polinomial com efeito entre os tratamentos e ajustados pela regressão quadrática, o ganho de peso, assim como o consumo de ração não apresentou estatisticamente diferença significativa entre os dois tratamentos, também sugerindo que estes parâmetros foram estatisticamente iguais. Com os parâmetros apoiados nas médias entre as fases avaliadas, seguindo o mesmo modelo estatístico citado acima, a estatística apresenta diferença significativa entre as fases (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação entre as médias de ganho de peso entre as fases avaliadas

Teste de Tukey		
Época	GP	
42	19,040250	a
28	6,2010000	b
14	2,1978750	c
DMS(5%) = 0,3379		

Neste estudo pode-se verificar que em todas as fases de criação que foram avaliadas, o ganho de peso médio dos lotes tratados com probiótico foi melhor quando comparados com os lotes que não receberam nenhum aditivo. (Tabela 6)

Tabela 6. Valores médios do Ganho de Peso Médio dos Lotes, em kg, nos diversos períodos de coleta de dados.

Períodos de coleta de dados	Ganho de Peso Médio dos Lotes (kg)		Porcentagem no aumento de ganho de peso (%)
	Tratamento 1*	Tratamento 2**	
01 a 14 dias	2,154 ^a	2,242 ^a	4,10%
15 a 28 dias	6,192 ^c	6,211 ^c	0,31%
29 a 42 dias	19,023 ^b	19,058 ^b	0,18%
01 a 42 dias	27,368 ^a	27,510 ^a	0,52%

* Tratamento 1 – ração comercial; ** Tratamento 2 – ração comercial com adição do probiótico. Letras semelhantes os valores não diferem estatisticamente, letras diferentes os valores diferem estatisticamente

Embora pela estatística os tratamentos não apresentaram significância entre si, ao comparar os resultados de ganho de peso dos tratamentos em cada fase, ele mostrou-se superior nos tratamentos com o probiótico do que sem, mesmo não sendo de forma expressiva, a utilização do produto foi eficaz ao desenvolvimento animal.

Os resultados de ganho de peso foram numericamente melhores com o aditivo comercial, tendo novamente a fase inicial (1 a 14) com melhor resultado de 4,10% e o menor resultado mas não pior do que o controle com 0,18% na fase de 29 a 42 dias.

Min et al (2016) demonstraram que a suplementação com *Bacillus subtilis* e mananoligossacarídeos em dietas basais para frangos de corte de 21 a 42 dias de idade, aumentou o ganho de peso em 1,17% e altura de vilosidades duodenais melhorando a superfície de absorção, porcentagem maior do que nosso trabalho para mesma fase que foi 0,18%.

Uma mistura de *B. subtilis* e *Saccharomices cerevisiae*, foram fornecidos à dietas de frangos de corte de 21 a 39 dias de idade para avaliar o crescimento, resultando em um efeito desta combinação que aumentou o ganho de peso dos animais que ingeriram esta mistura (CHEN et al, 2009).

Avaliando o efeito da suplementação com simbióticos na dieta de frangos da linhagem Arbor Acres(EUA) sobre seu desempenho, utilizou-se uma união de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Clostridium butyricum* e prebióticos oriundos de parede celular de levedura, constatando que aos 42 dias de criação o maior ganho de peso foi com aves suplementadas com o simbiótico do que sem, obtendo 2,8% maior ganho (CHENG et al, 2017), valor maior do que este trabalho que foi 0,52% nesta fase total. Romero et al (2014) em estudos com galinhas Ross em dois ensaios de idade de 12 a 21 e 32 a 42 dias para averiguar a contribuição de energia ileal de proteína, amido e gordura com duas combinações enzimáticas exógenas protease de *B. subtilis* e amilase *B. licheniformis*, em resposta comprovou aumento na digestibilidade ileal aparente de gordura para aves de 42 dias e aumento da digestibilidade ileal de proteínas aos 21 dias comparados ao controle.

A eficácia de *B. amyloliquefaciens* foi analisada na inibição da colonização intestinal por *Clostridium perfringens* em frangos de corte infectados com coccídios, aos 49 dias de idade um pequeno número de aves foram abatidas e pode notar uma queda da incidência dos sintomas coccidiais, bem como lesões intestinais com suplementação do *Bacillus* (TSUKAHARA et al, 2018).

A utilização dos *Bacillus* pode não somente satisfazer em resultados de desempenho de animais, disponibilidade de níveis nutricionais como proteína, carboidratos e lipídeos, mas também na supressão de agentes patogênicos e modulação da microbiota intestinal de aves, demonstrando que a utilização de *Bacillus* como probiótico na inclusão da dieta de frangos é eficiente na produção animal.

5.3 Conversão alimentar

Ao avaliar as médias da conversão alimentar utilizando a análise de regressão polinomial com efeito dos dias dentro de cada tratamento, houve diferença significativa no tratamento com probiótico da AGRIVALLE comparado com a ração sem aditivo (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação entre as médias de conversão alimentar entre tratamentos

Teste de Tukey		
Tratamento	CA	
Tratamento 1	2,1878750	a
Tratamento 2	1,9905000	b
DMS(5%) = 0,1608		

A conversão alimentar apresentou resultados significativos com o uso dos microrganismos benéficos a saúde, sendo que a fase inicial se destacou novamente com o melhor índice de conversão 9,2%, em segundo a fase de crescimento com 8,26% e a de menor expressão a terminação 3,32%, quando comparado ao grupo controle neste parâmetro avaliado (Tabela 8).

Sendo que estes resultados se apresentaram melhores que os anteriores, pois a conversão é calculada em função do consumo pelo ganho de peso, que foram numericamente melhores para este estudo, a conversão traduz os resultados obtidos.

Tabela 8. Valores médios do Conversão Alimentar Média dos Lotes, em kg, nos diversos períodos de coleta de dados.

Períodos de coleta de dados	Conversão Alimentar Média dos Lotes		Porcentagem na redução alimentar (%)
	Tratamento 1*	Tratamento 2**	
01 a 14 dias	2,188 ^a	1,990 ^b	9,92%
14 a 28 dias	1,550 ^a	1,432 ^a	8,26%
28 a 42 dias	1,224 ^a	1,185 ^a	3,32%
01 a 42 dias	1,589 ^a	1,535 ^a	3,48%

* Tratamento 1 – ração comercial; ** Tratamento 2 – ração comercial com adição do probiótico. Letras semelhantes os valores não diferem estatisticamente, letras diferentes os valores diferem estatisticamente

Foi verificado por Aliakbarpour et al. (2012), que obtiveram resultado significativo para a taxa de conversão alimentar em 3,1% de melhora e no peso corporal final quando comparado ao controle sem aditivo, em frangos de 42 dias que tiveram na alimentação a inclusão de *B. subtilis*, sendo esta taxa de conversão inferior deste trabalho que foi mais eficiente com índice de 3,48%.

Li et al (2015) conduziram um experimento para investigar os efeitos de *B. amyloliquefaciens* em frangos Arbor Acre sobre a função imune desafiados com dose extra de lipolissacarídeo (LPS) com aplicação intraperitoneal, constatando aumento do peso de baço em aves no tratamento com LPS mas sem *Bacillus* e redução do peso de baço em animais com LPS e com *Bacillus*, como uma significativa melhora da conversão alimentar.

Mcnaughton et al (2014) utilizando farinha de canola geneticamente modificada somada ao microrganismo *B. licheniformis* foi ministrado na alimentação de frangos Ross até 42 dias. O resultado não teve nenhum efeito significativo em desempenho, rendimento de órgãos e carcaças dos animais que consumiram esse preparo em relação as aves controle, mostrando não ser muito eficaz.

Knap et al. (2011) verificaram a eficácia de *B. subtilis* sobre a colonização de *Salmonella* no intestino e sua eliminação na cama de frangos de aves alimentadas

com o probiótico, apresentando 58% na redução do swabs de arrasto para *Salmonella*, favorecendo não só a produção, mas ajudando na redução da quantidade do agente infeccioso que entra na instalação, além disso melhorou numericamente a conversão alimentar das aves.

Dentre os parâmetros de desempenho analisados nas três fases, todas foram numericamente eficientes com a utilização dos gêneros bacterianos constituintes do composto probiótico, sobressaindo ao grupo controle. Evidenciando que os maiores percentuais na avaliação das três variáveis de desempenho foram na fase inicial onde os pintainhos necessitam de maiores níveis protéicos para produção de músculo, e idade em que teoricamente estão com o trato intestinal menos colonizado, facilitando a fixação pelos microrganismos utilizados.

Acredita-se que a eficiência do produto comercial teve resultado esperado, e a utilização pode ser indicada para a produção animal, em especial a avícola.

5.4 Detecção de *Bacillus* por PCR

Para a detecção dos três gêneros de *Bacillus* que constituem o aditivo foi realizado a técnica de PCR convencional a partir de swabs cloacais. Os resultados foram negativos para a amplificação dos genes de todos os gêneros de *Bacillus* e das 64 amostras analisadas, as bandas não foram amplificadas demonstrando que não teve a presença dos genes dos microrganismos desejados (Figura 3) e (Figura 4).

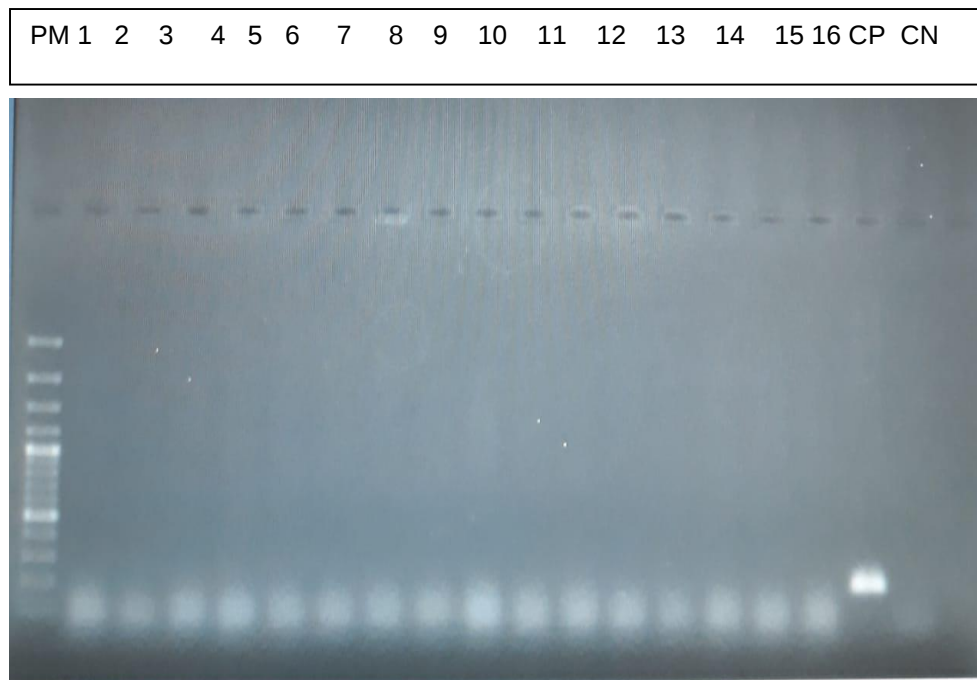


Figura 3. Linhas 1-16 amostras negativas para *Bacillus amyloliquefaciens* de frangos de corte. CP: Cepa padrão de *B. amyloliquefaciens* correspondente a 430pb. PM: Padrão molecular 100pb DNA Ladder. CN. Controle negativo.

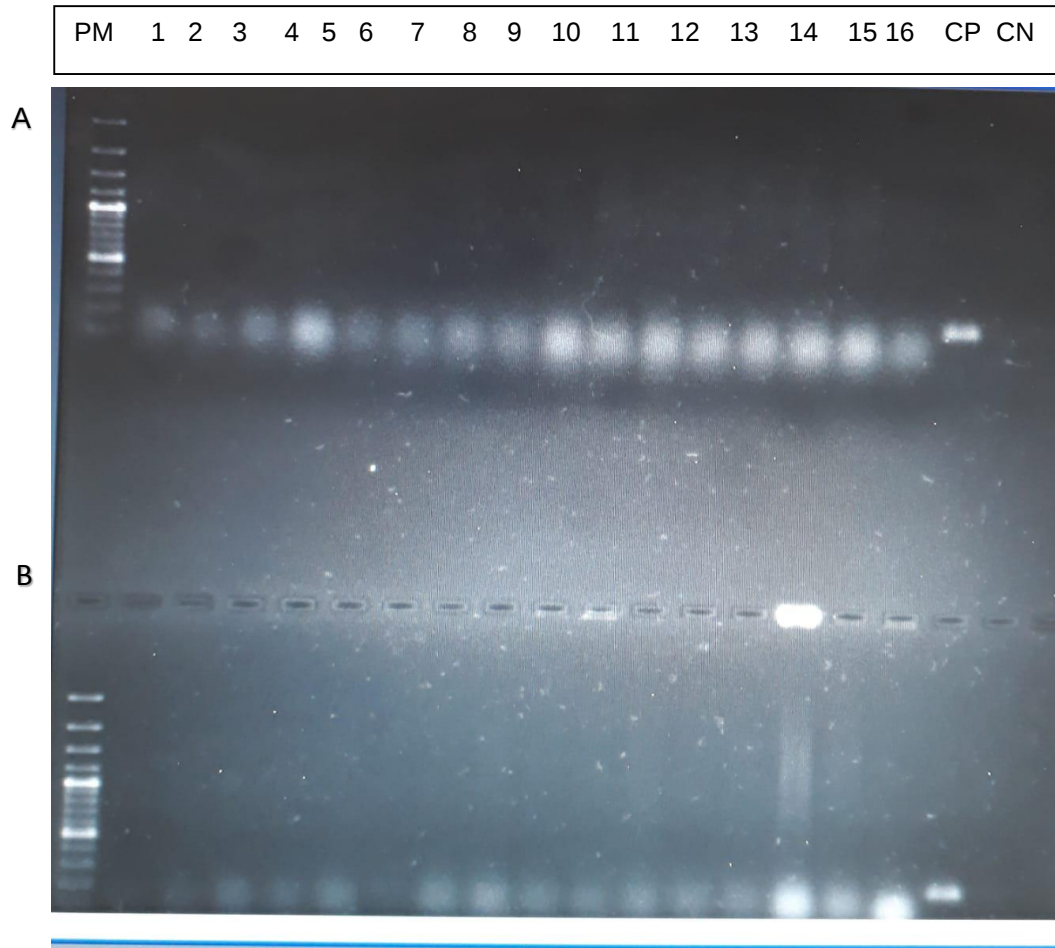


Figura 4.A. Linhas 1-16 amostras negativas para *Bacillus subtilis* de frangos de corte. CP: Cepa padrão de *B. subtilis* correspondente a 480pb. PM: Padrão molecular 100pb DNA Ladder. CN: Controle negativo. **B.** Linhas 1-16 amostras negativa para *Bacillus licheniformis* de frangos de corte. CP: Cepa padrão de *B. licheniformis* correspondente a 520pb. PM: Padrão mo-lecular 100pb DNA Ladder. CN: Controle negativo.

Tais resultados, suspeita-se que como não era uma cultura pura, e sim amostra de cloaca, havia vários gêneros e espécies bacterianas presentes e que poderiam ter se desenvolvido mais que os *Bacillus* e suprimido seu crescimento, resultando numa baixa concentração que não pode disponibilizar quantidade de DNA suficiente para sua confirmação.

E algumas pesquisas na literatura também informam que devido a um longo tempo em temperaturas baixas os microrganismos ou esporos podem demorar a ativar ou não. Além de condições adversas que possam ocorrer, por exemplo uma falta de energia não percebida que venha a descongelar amostras e depois retorno do congelamento pode acarretar em possível degradação da amostra.

Sabemos que a o teste de PCR é altamente confiável e efetivo, mas há a possibilidade de que os primers na reação não funcionaram.

6. CONCLUSÃO

Pelo presente estudo realizado, o probiótico Agrivalle foi eficaz no desempenho animal em relação a: redução no consumo de ração, aumento do ganho de peso e melhoria do fator de conversão alimentar nas três fases avaliadas, tendo a fase inicial como destaque. A detecção dos microrganismos que formavam o probiótico não foi confirmada nas fezes pelo teste de PCR. E a concentração dos microrganismos conforme informado no produto, foi confirmada com as diluições e contagem.

Portanto, a utilização do probiótico composto por *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* é recomendado na incorporação da dieta de frangos de corte favorecendo como alternativa para alavancar a produção deste setor.

7. REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual**. São Paulo, 2018. Disponível em: http://abpa.br.com.br/storage/files/versaofinalpara_envio_digitalrelatorioanual_2018. Acesso em 13 ago .2018.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual**. São Paulo. 2016. Disponível em:<<http://abpa.br.com.br/storage/files/versão-final-anual-2016>>. Acesso em: 11 de ago 2018.
- AHMED, S.T., IRLAM, M., MUN, H.S., SIM, H.J., KIM,Y.J., YANG, C.J. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* a probiotic strain na growth performance, cecal microflora and fecal noxious gas emissions of broiler chicken. **Poultry Science**. v.8. p.1963-1971. 2014.
- ALIAKBARPOUR, H.R., CHAMANI, M., RAHIMI, G., SADEGHI, A.A., QUJEG, D. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. **Austrian Australasian Journal Animal Science**. v.9, p.1285-1293.2012.
- ALVAREZ, L.C., BARRERA, E.M., GONZALEZ, E.A. Evaluation of growth promoters for broiler chickens.**Veterinária México**. v.25,p.141-144.1994.
- ALVES, C.S., FERNANDES, M.R.P., CARVALHO, M.A.V. Guia para prescrição de probióticos. Anais-UNIC-Congresso de iniciação científica da Unifev. 2017. Disponível em: <http://periodicos.unifev.edu.br/index.php/unic/article/view/1266>.
- APPELT, M.T., NUNES, R.V., POZZ, R.C., MOZA, W.T., VENURE, I., NUNES, C.G.V. Níveis de probiótico em rações de origem animal e vegetal para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34.n.4.p.765-777. 2010.
- BADARÓ, C.; VALENTE, A.C.L.; GUTIERRES, P.C.G.; MUNIZ, A.P.; REZENDE, ANA. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana. Nutrigerais. **Revista Digital de Nutrição**. v. 02, n.3. 2008.

BASSO, F.C.; LARA, E.C.; ASSIS, F.B.; RABELO, C.H.S.; MORELLI, M.; REIS, R.A. Fermentation characteristics and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.13, n.4, p.1009-1019. 2012.

BIOTECNAL. O fantástico mundo dos probióticos: manual técnico. São Paulo, s.d., 66p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde. Brasília. n.02. 2002. Disponível em: <http://e legis bus.br/leisfer/public/showAct.php>. Acesso em 09 de ago 2018.

BUENO, S.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. **Dissertação**. UNESP. São José do Rio Preto. 2008.

CAO, G.T.; ZHAN, X.A.; ZHANG, L.L.; ZENG, X.F.; CHEN, A.G.; YANG, C.M. Modulation of broilers caecal microflora and metabolites in response to a potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Animal Physiology an Animal Nutrition**. v.02, p.909-917. 2018.

CHEN, K.L., KWO, W.L., YOU, S.H., YEH, R.H., TANG, S.W., HSIEH, C.W. Effects of *Bacillus subtilis* var.natto and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. **Poultry Science**. v.2, p.309-315. 2009.

CHENG, Y., CHEN, Y., LI, X., YANG, W., WEN, C., KANG, Y., WANG, A. Effects of synbiotic supplementation on growth performance, carcass characteristics, meat quality and muscular antioxidant capacity and mineral contents in broilers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.11. p.3699-3705. 2017.

CHENG, Y.H.; ZHANG, N.; HAN, J.C.; CHANG, C.W.; HISIÃO, F.S.; YU, YH. Optimization of surfactin production from *Bacillus subtilis* in fermentation and its effects on *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis and growth performance in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 2018.

CHISTIYAKOV, V., MELNIKOV, V., CHIKINDAS, M.L., KHUSTSHUI, M., CHAGELISHVIL, A., BREN, A., KOSTINA, N., COUERA, V.E. Fórmula de soja fermentada em *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 em estado sólido para aves. **Bioscience of Microbiota Food and Health**. v.1, n. 34.p 25-28. 2015.

CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A. V. C.; CORRÊA, A. B.; SALLES, A. S.; MATTOS, E. S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.467-473, 2003.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs, 2003. **Disponível em:** <http://register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06/st06120en03.pdf>. Acesso em: 01 agosto 2018.

CUNHA, S.A.S. Avaliação no efeito de um probiótico na performance zootécnica e microbiota entérica em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) de produção. Dissertação. Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto.2013.

DELSHAD, T.; SOLTAMIAN, S.; SHARIFIYAZDI, P.; BASSIER, P. Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* in vitro and an in vivo evaluation of their probiotics effect in rainbow trout. **Journal of Fish diseases**. V.10. 2018.

DUPONT, C. Probiotiques et prebiotique. Journal de Pédatrie et de Puericulture. Paris. v.14, n.2, p.77-81. 2001.

EMPRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Aves e suínos. Estatística da produção de carne. Disponível em <http://www.emprapa.br/suinos-e-aves>. Acesso em: 14 de ago 2018.

FABRI, F.M.V & CHACÓN, J. Fatores que influem na produtividade do frango de corte moderno. Serviços Veterinários. Ceva Saúde Animal.2018. Disponível em: <http://opresenterural.com.br/noticia/fatores-que-influem-na-produtividade-do-frango-de-corte-moderno/12296/>.

FARIA, D.E.; HENRIQUE, A.P.F.; NETO, R.F.; MEDEIROS, A.A.; JUNQUEIRA, O.M.; FILHO, D.E.F. Alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**. v.10, n.1, p.18-28. 2009.

FATEC. **Probiótico Calsporin**. – boletim informativo, p.12. São Paulo. 1997.

FILHO, R.L., FERRO, H.M., PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**. p.4,nº2,p12. 2010.

FULLER R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal Applied Bacteriorology**. V.66, p.365-378, 1989.

GIONGO, J.L. **Produção, caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp***. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre/RS. Brasil. 2006.

HAMID, A., KHAN, F.Z., MUNID, A. Probiotic in poultry production. **Bangladesh Journal of Scientific and Insdustrial. Research**. V.29, p.1-12.1994.

HEAK, C.; SUKON, P.; SOMPLANG, P. Effect of direct-feed microbials on culturable gut microbiotas in broiler chickens: a meta-analysis of controlled trials. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**. 2018.

HENRY, P., AMMERMAN, C.B., MILES, R.D. Influence of virgiamycin and dietary manganese on performance, manganese utilization and intestinal tract weight of broilers. **Poultry Science**. v. 65, p.321-324.1986.

ISOLAURI, E. Quelles raisons pour in traitement probiotique chez les nourrissons allergiques. The rationale of probiotic theraphy in allergia infants. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**. v. 41, n.7, p.624-627. 2001.

IZAT, A.L., THOMAS, R.A., ADAMS, M.H. Effects of dietary antibiotic treatment on yield of commercial broilers. **Poultry Science**.v.68, p.651.1989.

JEYARAN, K.; ROMI, W.; SINGH, T.A.; ADEWUMI, G.A.; BASANTI, K.; OUNTOYINBO, F.A. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with insdustrial importance. **Journal of Microbiological Methods**. p.161-64. 2011.

KAWABATA, C.Y. Inovações tecnológicas na agroindústria da carne: estudo de caso. **Ciências Agrária e Ambientais**. v.6, n.4, p.529-532. 2008.

KNAP, L., KEHLET, A.B., BENNEDSEN, M., MATHIAS, G.F., HOFACRE, C.L., LUMPIKINS, B.S., JENSEN, M.M., RAUAN, M., LAY, A. *Bacillus subtilis* (DSM17229) significantly reduces Salmonella in broiler. **Poultry Science**. V.8, n.90,p.1690-1694.2011.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**. v.44, n.3, p.329-247. 2008.

KONIECZKA, P.; NOWICKA, K.; MADAR, T.M.; SMULIKOWKA, S. Effects of pea extrusion and enzyme andand probiotic suplemmentation on performance, microbiota activity and biofilm formation in the broiler gastrointestinal tract. **British Poultry Science**. 2018.

KONUARY, G.; ERGYNKAIA, Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. **Foods**. v.7, n.6, p.92. 2018.

LEI, K.; LI, Y.L.; YU, D.Y.; RAIPUT, I.R.; LI, W.F. Influence of dietary inclusion of *Bacillus licheniformis* on laying performance, egg quality, antioxidant anzyme activies, and intestinal barrier function of laying hens. **Poultry Science**. v.92, n.9, p.2389-2395. 2013.

LEI, X., XIANGSHU, P., YNGJUM, P., ZHANG, W., PERON, A., ZHANG, H. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* based direct fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chicken. **Asian Australasian Journal Animal Science**.p.239-246. 2015.

LI, Y., ZHANG, H., CHEN, Y.P., YANG, M.X., ZHANG, L.L., LU, Z.X., ZHOU, Y.M., WANG, T. *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress in lipopolysaccharide challenged broiler at early age. **Poultry Science**. v.7, p.1504-1511.2015.

LIN, Y.; XU, S.; ZENG, D.; NI, X.; ZHOU, M.; ZENG, Y.; WANG, H.; ZHOU,Y.; ZHU, H.; PAN, K.; LI, G. Disruption in the cecal microbiota of chickens challenged with

Clostridium perfringens and other factors was alleviated by *Bacillus licheniformis* supplementation. **Plos one**. v.18. 2017.

LIU, X., YAN, H., LU, L., XU, Q., YIN, C., ZHANG, K., WANG, P., HU, J. Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. **Asian Australasian Journal of Animal Science**. V.5,p.682-689. 2012.

MCNAUGHTON, J., ROBERTS, M., RICE, D., SMITH, B., HONG, B., DELANEY, B., LIAMS, C. Comparison of broiler performance and carcass yields when fed diets containing genetically modified canola meal from event DP73496-4, near isogenic canola meal, or commercial canola meals. **Poultry Science**. v. 7, p.1713-1723. 2014.

MARUTA, K. Probióticos e seus benefícios. Conferência 93 APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Anais. p.203-219. 1993.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M.; ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v. 3, n.1, p. 1-8, 2001.

MENTEN, J.F.M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, Brasil. **Anais...**Santos, p. 41-52.2005.

MIN, Y.N., YANG, H.L., XU, Y.X., GAO, Y.P. Effects of dietary of supplementation of synbiotics growt performance, intestinal morphology, slgA content and antioxidant capacities of broiler. **Journal of Animal Physiology ans Animal Nutrition**. v.6, p.1073-1080. 2016.

MYRVIK, N & WEISER, R.S. Fundamentals of medial bacteriology and micology. Edition 2, p.220. 1988.

OLSVIK, O; STROCBINE, N.A. PCR Detection of Heat-Stable, Heat-Labile, and Shiga-Like Toxin Genes in Escherichia coli. In: PERSING, D.H; SMITH, T.F; TENOVER, F.C; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology**. Washingto:ASM, p.271-276, 1993.

- PAZ, M.C.F. Identificação e caracterização de *Bacillus licheformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pernambuco. 2005.
- POURABEDIN, M., ZHAO, X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. **Enviromental Micribiology**. p.362. 2015.
- REID, G.; BRUCE, A.W.; FRASER, N.; HEINEMAM, C.; OWEN, J.; HENNING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. FEMS. **Immunology Medial Microbiology**. v.30, p.49-52. 2001.
- RIBAS, J.C.R. Multiprobiótico, probiótico, e antibiótico na alimentação de leitões desmamados. Dissertação. UFMT. Cuiabá 2014.
- ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructane. **Brazilian Journal Nutrition**. v.93, p.513-525. 2005.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista **Brasileira de Ciências Farmaceuticas**. v.42,n.01.2006.
- SALMIEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, YK. Probiotics: how should they be defined. **Trends in Food Science & Tecnology**. v.10, p.107-110. 1999.
- SANDERS, M.E. Probiotics considerations for human health. **Nutrition Review**. v.61, n.3, p.91-99. 2003.
- SCHULTZ, D., BONELLI, R.R., BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus spp.* para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nurição Araraquara** v.16,n4,p.403-411. 2005.
- SILVA, C.R & PINHEIRO, A.L.B.C. Utilização de probiótico como melhoradores no desempenho de aves. **Revista eletrônica Nutritime**. v.5, n.6, p.690-706. 2008.
- SUGIHARTO, S.; YUDIARTI, T.; ISROLI, I.; WIDIASTUTY, E.; WAHYUNI, H.I. Hematological parameters and selected intestinal microbiota populations in the Indonesian indigenous cross bred chickens fed basal diet supplemented multi-strain probiotic preparation in combination with vitamins and minerals. **Veterinary World** .v.6, p.874-882. 2018.

- SOUZ, L.F.A., ARAÚJO, N., ASTOLPHI, J.L.L., DIAS, L.B.M., AMBUEL, A.C., SANTOS, L.S, CARMO, A.J. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. **Colloquium Agrarie**.v.6.n.2.p.33-39. 2010.
- STANTON, C.; RON, R.P.; FITZGERALD, G.F; VAN, S. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**. v.16, p.196-203. 2005.
- STRADA, E.S.O.; ABREU, R.D.; OLIVEIRA, G.J.C.; COSTA, M.C.M.M.; CARVALHO, G.J.L.; FRANCA, A.S.; CLARTON, L.; AZEVEDO, J.L.M. Uso de enzimas na Alimentação de Frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.6, p.2369-2375. 2005.
- SUPRIYAT, H.T., SUSANTI, T., SUGANA, W. Nutritional value of rie bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chicken. **Asian Australasian Journal of Animal Science**. P.231-238,v.2. 2015.
- TAVARES, L.P.; RIBEIRO, K.C.S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente a influenza aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**. v.9, n.1, p.79-88. 2007.
- TINOCO, I.F.F. Avicultura Industrial: Novos Conceitos de Materiais, Concepções e Técnicas Construtivas Disponíveis para Galpões Avícolas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.3, n.1, Campinas. 2001.
- TODOVORA, S.; KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.96, p.1151-1161. 2009.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. Microbiologia 6° edição. Artemed Editora.p827. 2003.
- TOWSED, J.K.; BENDER, D.; VENTREASSE, W.C.; SAPP, P.A.; TOY, A.M.; CLINT, A.W.; JOHNSON, K.D. Effects of probiotics (*Bacillus subtilis* DE111) supplementation on immune function, hormonal status, and physical performance in division baseball players. **Sports**. v.6. 2018.

URDACI, M.C.; LEVEFRE, M.; LAFFORGUE, G.; CARTIER, C.; RODRIGUEZ, B.; FIORAMONT, J. Antidiarrheal action of *Bacillus subtilis* CV1 CNCM/i-275 and *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4597 in mice. **Frontier Microbiology**. v.9. 2018.

TSUKAHARA, T., INOUE, R., NAKAYAMA, K., INATOMI, T. Inclusion of *Bacillus amyloliquefaciens* strain TOA5001 in the diet of broilers suppresses the symptoms of coccidiosis by modulating intestinal microbiota. **Journal Animal Science**. v.4, n.89, p.679-687. 2018.

XU, S., LIN, Y., ZENG, D., ZHOU, M., ZENG, Y., WANG, H., ZHOU, Y., ZHU, N., PANSK, K., DING, B., NI, X. *Bacillus licheniformis* normalize the ileum microbiota chickens infected with necrotic enteritis. **Scientific Reports**. v.8. 2018.

WANG, X.; KIESS, A.S.; PEEBLES, E.D.; WAMSLEY, K.G.S.; ZHAI, W. Effects of *Bacillus subtilis* and zinc on the growth performance, internal organ development, and intestinal morphology of male broilers with or without subclinical coccidian challenge. **Poultry Science**. 2018.

YANG, Y.; JING, Y.; YANG, J.; YANG, Q. Effects of intranasal administration with *Bacillus subtilis* immune cells in the nasal mucosa and tonsils piglet. **Experimental and Therapeutic medicine**. V.15, p. 5189-5198. 2018.