**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Probiótico na ração de frangos de corte submetidos a
antibioticoterapia: desempenho e microbiota intestinal**

Rafaela Pereira

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de Concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

Rafaela Pereira
Zootecnista

**Probiótico na ração de frangos de corte submetidos à antibioticoterapia:
desempenho e microbiota intestinal**

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN

Tese apresentada para obtenção título de Doutora
em Ciências. Área de Concentração Ciência Animal
e Pastagens

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Pereira, Rafaela

Probiótico na ração de frangos de corte submetidos a antibioticoterapia:
desempenho e microbiota intestinal / Rafaela Pereira. - - Piracicaba, 2014.

78 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Microbiota intestinal 2. Probiótico 3. Terapia com antibiótico 4. Classificação
Filogenética I. Título

CDD 636.513
P436p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

*Aos meus pais Aroldo e Dirlene que são a minha luz e a minha força,
um amor incondicional que me motiva dia a dia, e são o alicerce de todas
as minhas conquistas;*

*Aos meus amados irmãos Rafael e Michel, que mesmo distantes saibam
que vocês são a minha inspiração para continuar caminhando....*

Ofereço

*A Deus e ao Divino Espírito Santo que iluminam sempre o meu
caminho, e intercede por mim em todas as fases e decisões de minha
vida! .*

Homenageio

*Meus amados avós Samuel e Dalva (in memoriam) que não mediram
esforços no apoio de todas as batalhas em minha vida! Quantas
saudades eu sinto de vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A FAPESP, pela bolsa de estudo durante o curso de doutorado e pela bolsa de estágio no exterior (programa BEPE).

Ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, pela excelente orientação, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Valdomiro Shigueru Myiada, por todos os preciosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreotte pela cooperação para esta pesquisa, e principalmente, pela disponibilidade do laboratório de Microbiologia molecular do Departamento de Ciência dos Solos para realização de todas as análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pelo auxílio na técnica de sequenciamento.

Ao Ademir Durrer pela essencial ajuda na execução de todas as análises moleculares.

Ao professor Matthew Koci e Bryan Troxel, assim como toda a equipe de trabalho da Universidade do Estado da Carolina do Norte, agradeço pelos conhecimentos, paciência e amizade durante o doutorado sanduíche.

Aos amigos da pós-graduação, Cristiano Bortoluzzi, Naiara Simarro Fagundes, Glaucia Samira Napty, Jaqueline Moreira Rafael, José Guilherme, Maicon Sbardella, Kelen Zavarize e Michele Bernardino. Agradeço a vocês pela ajuda na execução de toda a pesquisa e principalmente pelo excelente convívio e amizade.

Aos amigos do departamento de Ciência dos Solos, Diogo Paes, Thiago Gumiere, Júlia Lima, Joelma Marcon e Pedro de Andrade, pela ajuda no laboratório com as técnicas e análises moleculares.

Aos funcionários do Setor de Avicultura, Alexandre, Filó, Chico, Carlão, Gaúcho e Paulinho pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos funcionários do departamento de Ciência dos Solos, Denise e Fernando pelo auxílio no trabalho de laboratório.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Zootecnia de não ruminantes, em especial Sandra e José Henrique Rocha por toda amizade durante o curso.

Às minhas companheiras de república Glaúcia, Kathelyn, Samara, Simone, Jane, Michele, Paula e Aline por todo convívio.

"Nunca permita que alguém corte suas asas, estreite seus horizontes e tire as estrelas do teu céu. Nunca deixe seus medos serem maiores que a tua vontade de voar. O valor da vida está nos sonhos que lutamos para conquistar".

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL	16
2.2 INTERAÇÕES MICROBIOTA E HOSPEDEIRO.....	17
2.3 ANTIBIOTICOTERAPIA	18
2.4 PROBIÓTICOS	20
2.5 ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 AVES, MANEJO E TRATAMENTOS	23
3.2 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	26
3.2.1 Preparo das amostras	26
3.2.2. Preparo do pélete bacteriano	27
3.2.3 Extração do DNA das amostras do conteúdo intestinal.....	28
3.2.4 Estrutura da comunidade bacteriana por T-RFLP	29
3.2.5 Quantificação de Bactéria através da PCR em tempo real	31
3.2.6 Sequenciamento	32
4 RESULTADOS	36
4.1 DESEMPENHO.....	36
4.2 TERMINAL RESTRICTION LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP).....	39
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ATRAVÉS DE QPCR.....	45
4.4 SEQUENCIAMENTO	47
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70

RESUMO

Probiótico na ração de frangos de corte submetidos a antibioticoterapia: Desempenho e microbiota intestinal

Este estudo teve o objetivo de avaliar a eficiência do probiótico em manter o equilíbrio da microbiota intestinal de aves submetidas à antibioticoterapia e as associações com o desempenho. Os tratamentos dietéticos consistiram de uma dieta basal única, à base de milho e farelo de soja, à qual foi acrescido ou não o probiótico *Bacillus subtilis* (100 g/ton de ração), na concentração de 10^{11} UFC/g. Por 3 dias consecutivos a partir de 21 dias de idade, as aves foram submetidas à antibioticoterapia via água de bebida consistindo de 200 ppm de bacitracina metileno dissacilato (efeito em bactérias Gram-positivas) e 1000 ppm de sulfato de neomicina (efeito em bactérias Gram-negativas). O experimento foi conduzido com frangos de corte no período de 1 a 42 dias, sendo que de 1 a 21 dias as aves receberam somente o tratamento dietético, e, a partir de 21 dias, as aves receberam os tratamentos dietético e terapêutico. Aos 2, 4 e 6 dias após a antibioticoterapia, 3 aves de cada unidade experimental foram sacrificadas para coleta do conteúdo do intestino delgado e do ceco e obtidos “pools” dos conteúdos intestinais em cada unidade experimental para constituir uma repetição. O experimento foi realizado com 4 tratamentos, obedecendo a esquema fatorial 2×2 para as variáveis de desempenho (com e sem probiótico $\times$ com e sem antibioticoterapia) com 9 repetições e $2 \times 2 \times 3$ para as análises da microbiota intestinal (com e sem probiótico na dieta $\times$ com e sem antibioticoterapia $\times$ 2, 4 e 6 dias após a antibioticoterapia) com 3 repetições. O DNA total foi extraído dos conteúdos do intestino delgado e ceco para o isolamento da região 16S rRNA e análise das comunidades bacterianas. As técnicas moleculares utilizadas foram a de *fingerprinting* Terminal Restriction Length Polymorphism (T-RFLP), PCR em tempo real (qPCR) e o sequenciamento, sendo que, para todas as técnicas, a região alvo foi o gene 16S rRNA. Os fatores dietético e terapêutico modularam a microbiota intestinal de forma independente. Houve efeito dos fatores probiótico e antibioticoterapia nos grupos predominantes do conteúdo do intestino, desde a classificação taxonômica filo até a classificação gênero. Alguns grupos filogenéticos foram igualmente afetados pelos 2 fatores em estudo, enquanto que outros grupos foram alterados de forma específica em função do probiótico ou antibioticoterapia. A antibioticoterapia, assim como o probiótico dietético, reduziu o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) no conteúdo do ceco. O melhor desempenho observado nas aves alimentadas com dietas com probiótico provavelmente está relacionado às alterações observadas na estrutura das comunidades intestinais e grupos filogenéticos, como o acréscimo de *Lactobacillus* e redução de Clostridiales. A antibioticoterapia modificou a estrutura da comunidade bacteriana, entretanto não provocou queda no desempenho das aves. A comunidade bacteriana do intestino das aves medicadas e suplementadas com probiótico apresentou alta similaridade com a comunidade das aves que receberam apenas probiótico dietético, indicando a possível recuperação da microbiota intestinal aos 6 dias após a antibioticoterapia.

Palavras-chave: Microbiota intestinal; Probiótico; Terapia com antibiótico; Classificação Filogenética

ABSTRACT

Dietary probiotic in broiler chickens submitted to antibiotic therapy: performance and intestinal microbiota

The purpose of this study was to verify the ability of a probiotic in the feed to maintain the stability of gut microbiota in chickens after antibiotic therapy and associations with the performance. The dietary treatments consisted of a corn-soybean meal basal diet that was supplemented or not with a probiotic (*Bacillus subtilis*) in the concentration of 3×10^9 cfu/kg of feed. Starting on day 21, the birds were submitted to the antibiotic therapy consisting of 200 ppm of bacitracin methylene disalicylate (for Gram-positive bacteria) and 1,000 ppm of neomycin sulfate (for Gram-negative bacteria) in the drinking water, during 3 days. The trial was conducted with broiler chickens from 1 to 42 days of age, however, from 1 to 21 days, the chickens received only the dietary treatment, and after of the 21 days, the birds received the dietary and therapeutic treatments. At 2, 4 and 6 days after the antibiotic therapy, three chickens from each experimental unit were euthanized and the contents of the small intestine and ceca were collected and pooled by pen. The trial was conducted in a completely randomized design with 4 treatments and 9 replicates in a 2×2 factorial arrangement for performance characteristics (with and without probiotic $\times$ with and without antibiotic therapy), and in a $2 \times 2 \times 3$ factorial arrangement for gut microbiota (with and without probiotic $\times$ with and without antibiotic therapy $\times$ 2, 4 and 6 days after of the antibiotic therapy) with 3 replicates per treatment. The DNA was extracted from the contents of the small intestine and ceca to isolate the 16S r RNA and study of the bacterial communities. The molecular techniques used were the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), quantitative PCR (qPCR) and sequencing, considering the 16S rRNA -gene-targeted. The dietary and therapeutic factors modulated the gut microbiota independently. The probiotic and antibiotic therapy affected the main groups within of the gut content from the phylogenetic classification at the phylum level until the phylogenetic classification at the genera level. Some phylogenetic groups were equally affected by the two factors while other groups were changed in a distinct form depending on of the probiotic or antibiotic therapy. The antibiotic therapy and dietary probiotic decreased the number of taxonomic operational unit (OTUs) in cecal content. The improved performance observed in birds supplemented with probiotic was probably related to changes in the structure of intestinal bacterial communities and phylogenetic groups such as higher *Lactobacillus* and decreased Clostridiales. Antibiotic therapy modified the bacterial community structure; however it did not cause loss of broiler performance. The gut bacterial community in birds medicated and supplemented with probiotic had high similarity with the gut community of birds that received dietary probiotic only, indicating the possible recovery of the gut bacterial community 6 days after the antibiotic therapy.

Keywords: Gut microbiota; Probiotic; Antibiotic therapy; Phylogenetic classification

1 INTRODUÇÃO

A antibioticoterapia, administrada via água ou ração, é essencial para controle de diversas doenças, sejam elas intestinais ou sistêmicas, e esta intervenção pode alterar a estabilidade da microbiota intestinal das aves (disbiose). Na produção avícola industrial têm sido relatados os efeitos negativos no desempenho das aves após a medida terapêutica com antibióticos, entretanto, não existem estudos que demonstrem estes efeitos nos índices produtivos e fatores relacionados à saúde intestinal das aves. Por outro lado, existem muitos estudos que relatam a capacidade da antibioticoterapia em romper o equilíbrio da microbiota existente no intestino de humanos, permitindo o crescimento de micro-organismos que induzem a diarreia (KARKOW; FAINTUCH; KARKOW, 2007; WILLING et al., 2011).

A restrição do uso de antibióticos em rações como promotores de crescimento tem resultado em maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças entéricas e disbiose, bem como causado efeito negativo na produtividade de frangos de corte. Desta forma, é importante a utilização de aditivos alternativos aos antibióticos, e, nos últimos anos, as pesquisas têm mostrado vários efeitos benéficos da utilização de probióticos (HANAMANTA et al., 2011; ZHANG; KIM, 2014; ZHANG et al., 2014) nas dietas das aves. Os probióticos são micro-organismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro através da melhoria das propriedades da microbiota intestinal existente (FULLER, 1992). A dominância de micro-organismos benéficos sobre os patogênicos na microbiota intestinal é essencial para saúde intestinal das aves e está diretamente relacionada à adequada absorção de nutrientes no intestino delgado e ao desempenho da ave. As alterações da microbiota intestinal podem acarretar diversos prejuízos à saúde intestinal, através do aumento da ocorrência de doenças e perdas na produtividade dos frangos de corte. A utilização de probiótico auxilia na recuperação da microbiota benéfica do trato gastrointestinal de humanos após a antibioticoterapia (PLUMMER et al., 2005).

A maioria das determinações da diversidade microbiana do trato gastrointestinal realizadas até recentemente foram geradas através de meios de cultura de micro-organismos; no entanto, muitas das bactérias (até 90% de acordo com algumas estimativas) são incapazes de crescer nas condições de cultivo (LAN et al., 2002). Em contrapartida, o estudo da microbiota intestinal através de técnicas

moleculares é, sem dúvida, uma metodologia eficiente para conhecer e entender o ecossistema intestinal. As alterações na microbiota de diferentes segmentos do trato digestório em função de ingredientes, aditivos, tipos de cama, idades e infecções foram avaliadas em trabalhos mais recentes usando as técnicas de PCR quantitativo (ABILDGAARD et al., 2010; LUND; BJERRUM; PEDERSEN, 2010), DGGE (CRESSMAN et al., 2010; LA-ONGKHUM et al., 2011; LEE et al., 2010; PEDROSO; MENTEN; LAMBAIS, 2005; OVIEDO-RONDON et al., 2010; PEDROSO et al., 2006; ZHOU et al., 2007; T-RFLP (GEIER et al., 2010; GONG et al., 2002) e sequenciamento (SERGEANT et al., 2014; SINGH et al., 2014). As técnicas baseadas na similaridade do DNA ou RNA de genes selecionados na comunidade microbiana têm sido utilizadas com sucesso para caracterizar o ecossistema intestinal (PEDROSO, 2011).

OBJETIVOS

Avaliar a eficiência da adição de probiótico em dietas de frangos de corte na manutenção da estrutura da microbiota intestinal de aves submetidas a tratamento com antibiótico e a associação com o desempenho produtivo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal das aves possui biodiversidade em micro-organismos, sendo composto principalmente por bactérias (>95%), arqueas metanogênicas (>0,2%), eucariotos (>2%), e vírus (>0,2%) (SINGH et al., 2014). Em condições normais, a flora intestinal é essencial para a saúde, nutrição, proteção da estrutura intestinal e homeostase (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). Os principais grupos bacterianos em animais não ruminantes são *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Propionibacterium*, em diferentes proporções no intestino delgado e ceco (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). A porcentagem de diferentes grupos microbianos varia entre indivíduos, dependendo da idade (MUELLER et al., 2006) e status patológico (ABT; ARTIS, 2009). Em aves, os principais sítios de atividade bacteriana são o papo e o ceco, e, em menor

extensão, o intestino delgado. Existe uma grande proporção de bactérias Gram-positivas e principalmente anaeróbicas facultativas no papo e na porção final do íleo, enquanto no ceco predominam os anaeróbicos estritos (LU et al., 2003).

Os principais constituintes da microbiota de aves são bactérias Gram-positivas com tolerância variável ao oxigênio. Devido à variação na disponibilidade de substrato ao longo do trato gastrointestinal, ocorrem modificações da população microbiana ao longo do tubo digestivo. Nas porções proximais do trato gastrointestinal, como papo e moela, se observam em média 10^2 a 10^3 bactérias por grama de conteúdo, enquanto que nas porções finais este número alcança 10^{11} bactérias por grama. No íleo existem 10^9 bactérias por grama de conteúdo (APAJALAHTI et al., 2004). No ceco há menor taxa de renovação de células epiteliais (1 a 2 vezes/dia) que permitem o desenvolvimento bacteriano e diversidade (APAJALAHTI; KETTUNEN; GRAHAM, 2004).

Os micro-organismos estão localizados no lúmen intestinal, dentro da camada de muco ou aderidos na mucosa digestiva (FULLER, 1984). A microbiota do trato gastrointestinal pode ser alterada pelos componentes da ração fornecida às aves. Estudos da comunidade intestinal baseado no 16S rDNA mostram que a dieta, hospedeiro e morfologia influenciam ecologia microbiana do trato gastrointestinal (LEY et al., 2008). A integridade intestinal é importante, pois pode traduzir-se em maior eficácia nos processos de digestão e absorção de nutrientes, com redução na colonização por bactérias patogênicas capazes de danificar a mucosa (OLIVEIRA; MORAES, 2007).

Embora a microbiota intestinal represente uma barreira contra a invasão de micro-organismos patogênicos, estes podem ter sua entrada facilitada quando a integridade da microbiota é afetada por estresse, terapia antibiótica, mudanças na dieta e alterações fisiológicas no intestino (BILLOO et al., 2006).

2.2 Interações microbiota e hospedeiro

A relação microbiota e hospedeiro é importante, pois de uma forma geral a microbiota atua na disponibilidade de nutrientes e regulação da função imune do hospedeiro. Os ácidos graxos voláteis (AGV), tais como ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, são produzidos pela fermentação microbiana dos polissacarídeos não amiláceos (PNAs) no ceco das aves (MEIMANDIPOUR et al.,

2011). Estes ácidos propiciam vários efeitos benéficos às aves, como atuando na regulação da mucosa intestinal, inibindo o crescimento de patógenos através da redução do pH e melhorando a absorção de minerais. O ácido butírico é capaz de reduzir a infecção por *Salmonella* em aves (VAN IMMERSEEL et al., 2005) e também estimula o crescimento celular epitelial (KIEN et al., 2007).

As atividades bacterianas do trato gastrointestinal afetam a utilização de nutrientes pelas aves. As bactérias do intestino precisam e consomem energia; desta forma, pode ocorrer competição pela energia entre microbiota e hospedeiro, limitando os valores de energia metabolizável das dietas para as aves (FURUSE; YOKOTA, 1984). A microbiota auxilia na melhoria da digestão, no metabolismo e utilização de nutrientes através da redução do pH intestinal e produção de ácido láctico (DHAMA et al., 2011). As bactérias do intestino também auxiliam no metabolismo de minerais e síntese de vitaminas (biotina, vitamina B₁, B₂, B₁₂ e K) que são responsáveis pelo crescimento e metabolismo das aves (DHAMA; SINGH, 2010).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é a primeira linha de defesa pelo qual os animais resistem à invasão de patógenos. O GALT é distribuído ao longo de todo o intestino dos frangos de corte. As comunidades microbianas que vivem no trato gastrointestinal podem estimular estas respostas imunes e agir nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, as bactérias ácido lácticas têm demonstrado propriedades imunoestimulatórias pelos componentes da parede celular tais como peptidoglicanos, polissacarídeos e ácido teicóico (HALLER et al., 1999).

A administração de agentes antimicrobianos, na forma terapêutica ou profilática, modifica o equilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota normal (SULLIVAN; EDLUND; NORD, 2001).

2.3 Antibioticoterapia

Os efeitos da antibioticoterapia em humanos têm sido bastante estudados e a literatura que aborda este tema é extensa; no entanto, o efeito negativo que este tratamento causa na produção avícola industrial é muito pouco entendido e estudado.

Antibioticoterapia é importante para o tratamento de doenças provocadas por bactérias. Os antibióticos orais são prescritos não somente para infecções intestinais

como também infecções que ocorrem em outras partes do organismo, como o trato respiratório ou urinário. Alguns antibióticos são seletivamente administrados contra bactérias patogênicas específicas. Entretanto, a maioria dos antibióticos produzidos tem amplo espectro de ação, e, desta forma, podem ser utilizados para o tratamento de diversas doenças (NATHAN, 2004).

O tratamento com antibiótico normalmente causa redução na diversidade da microbiota em humanos (JERNBERG et al., 2007), entretanto, a comunidade bacteriana tem a capacidade de recuperar-se e restaurar a microbiota do período anterior ao tratamento em alguns dias ou semanas (DETHLEFSEN et al., 2008). Após a antibioticoterapia, alguns grupos bacterianos são recuperados e tornam-se similares aos grupos de bactérias do período anterior ao tratamento terapêutico, embora, outros grupos não sejam afetados pela terapia e mantidos constantes (JAKOBSSON et al., 2010).

Os micro-organismos que são afetados pela antibioticoterapia não são limitados a aqueles alvos do antibiótico. Ocorre uma complexa dependência entre os membros da microbiota através dos produtos metabólitos produzidos e das rotas metabólicas de utilização. Existe uma cooperação entre os micro-organismos para disponibilizar nutrientes ou metabólitos secundários ou para remoção de produtos não utilizados que se tornam tóxicos (BELENGUER et al., 2006). Este efeito foi observado em humanos, quando um grupo de pessoas foi tratado com vancomicina (efeito em bactérias Gram-positivas) e observou-se redução na população de bactérias Gram-negativas (ROBINSON; YOUNG, 2010).

De uma forma geral, os antibióticos têm diferentes efeitos na diversidade, biomassa bacteriana e capacidade da microbiota em recuperar-se após o tratamento (ANTONOPOULOS et al., 2009). Embora o espectro de atuação do antibiótico seja importante, a dose administrada também é essencial pra determinação do impacto do medicamento na microbiota. A forma com que a microbiota responde à antibioticoterapia é dependente da quantidade do medicamento que é utilizado e do tempo de tratamento (DETHLEFSEN; RELMAN, 2011).

As mudanças induzidas pelo tratamento com antibiótico e que são importantes para regulação da microbiota e da imunidade do hospedeiro incluem a perda de “Toll Like Receptors” (TLR), que são ligantes reconhecidos pelo hospedeiro, as alterações nos metabólitos produzidos pela microbiota e a perda de sinais bacterianos específicos (WILLING; RUSSELL; FINLAY, 2011).

Os distúrbios na microbiota são frequentemente associados com diarreia, gastrite e prurido em humanos (NASTRO; FINEGOLD, 1972), assim como infecções fúngicas. Outra importante área de preocupação da utilização de antibióticos são as propriedades de resistência bacteriana, causada pelo uso contínuo dos antibióticos.

Estudos demonstram que a redução da microbiota, como consequência do tratamento com antibiótico, resulta em redução de TLR e regulação de defesa do sistema inato (WILLING; RUSSELL; FINLAY, 2011).

2.4 Probióticos

Os aditivos são substâncias utilizadas nas rações com finalidades de modificar benéficamente as características químicas, físicas, microbiológicas e sensoriais das rações com o objetivo de melhoria do desempenho dos animais (BERTECHINI, 2006). Os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios para a saúde do hospedeiro. Os probióticos podem promover o equilíbrio da microbiota intestinal e melhorar o ganho de peso e a eficiência alimentar das aves, possivelmente, por competirem com os patógenos no intestino e evitarem lesões no vilo, permitindo a regeneração da mucosa intestinal (SATO; LODD; NAKAGHI, 2002). Esta competição em que os micro-organismos benéficos são favorecidos é importante, pois o desequilíbrio em favor de bactérias patogênicas pode resultar em infecção intestinal, o que compromete a digestibilidade de nutrientes da ração (ARAÚJO et al., 2007).

O uso de substâncias profiláticas e terapêuticas como probiótico, prebiótico e simbiótico é uma medida que pode atuar na manutenção da microbiota intestinal durante o tratamento com antibiótico e na recuperação de populações comensais benéficas. Em humanos, os probióticos têm sido utilizados na proteção contra diarreia induzida pelo antibiótico, em distúrbios na comunidade intestinal e na redução do desenvolvimento de linhagens resistentes aos antibióticos (PLUMMER et al., 2005). O aumento da microbiota benéfica através dos probióticos é importante para produção de produtos metabólicos promotores de saúde como os ácidos graxos de cadeia curta, que podem prevenir o excessivo crescimento de bactérias patogênicas endógenas ou externas (MACFARLANE, 2014).

Alguns dos mecanismos de ação dos probióticos em aves são o aumento da produção de ácido láctico, com diminuição do pH intestinal, que é prejudicial aos agentes patogênicos; produção de peróxido de hidrogênio, que tem ação bactericida

conhecida; produção de substâncias antibióticas como acidofilina, acidolina, lactobacilina e niasina; alteração do potencial de redução/oxidação do intestino e prevenção do acúmulo de amins tóxicas e de amônia (NUNES, 1998).

Dois mecanismos básicos pelos quais os probióticos atuam para manter a população microbiana benéfica constituem exclusão competitiva e modulação imunológica. A exclusão competitiva envolve a competição por substratos, produção de metabólitos antimicrobianos que inibem patógenos, e competição por sítios de fixação (YANG; IJI; CHOCT, 2009). A modulação imunológica é o estímulo imunológico da mucosa intestinal, com produção de anticorpos tipo IgA que bloqueiam os receptores e reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal (JIN et al., 1997). Com base nestes mecanismos, os probióticos têm sido testados quanto a sua eficácia no controle de *Salmonella* em frangos de corte e vários estudos (HIGGINS et al., 2007; STERN et al., 2001) mostraram resultados positivos.

Para Jin et al. (1997) e Tournut (1998), um bom probiótico deve possuir as seguintes características: sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal, como à ação da bile e dos outros sucos (gástrico, pancreático e entérico), e assim ter condições de permanecer no ecossistema intestinal; não ser tóxico nem patogênico para homens e animais; ser estável durante a estocagem e permanecer viável por longos períodos em condições normais de armazenamento; e finalmente, ter capacidade antagônica às bactérias intestinais indesejáveis e promover efeitos benéficos ao hospedeiro. Os esporos de *Bacillus subtilis* têm sido um probiótico bastante utilizado devido à resistência dos mesmos no meio ambiente e resistência à estocagem em temperatura ambiente (HONG; DUC; CUTTING, 2005).

Os efeitos no desempenho e mortalidade com o uso de probióticos são inconsistentes. Existem trabalhos com resultados positivos no desempenho das aves e digestibilidade dos nutrientes (FRITTS et al., 2000; SEN et al., 2012; VILA et al., 2009; ZANG; KIN, 2014) e resultados sem efeito em relação a dieta controle (sem utilização de probiótico) (APPELT et al., 2010; PAZ et al., 2010; WAITITU et al., 2014). Esta variabilidade de resultados pode ser justificada pelas diferentes fontes de probióticos, pelos níveis de inclusão, pela idade das aves e pela forma de fornecimento (adição em água ou ração). Além disso, há muitos fatores nutricionais, de meio ambiente (condições sanitárias) e de manejo que podem comprometer a efetividade dos probióticos (EDENS, 2003).

2.5 Estudo da microbiota intestinal

Há alguns anos, as principais avaliações e identificações de bactérias foram baseadas em técnicas tradicionais de cultivo. A técnica de meio de cultura utilizada para verificar a comunidade bacteriana possui a desvantagem de selecionar alguns micro-organismos enquanto exclui outros (LAN, 2005). Para solucionar este problema, metodologias de biologia molecular foram desenvolvidas para o estudo da microbiota intestinal e este avanço tem contribuído para o conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados de estudos baseados em amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes de 16S rRNA, demonstraram que a diversidade de micro-organismos em amostras da microbiota intestinal das aves é vasta. Utilizando-se de técnicas moleculares, foi verificado que 90% das bactérias do trato gastrointestinal de frangos de corte eram desconhecidas pela técnica de meio de cultura (LAN et al., 2002). Muitas das técnicas caracterizam o RNA ribossômico o que possibilita a detecção do perfil composicional da comunidade bacteriana. Essas técnicas moleculares incluem bibliotecas de clones de 16S rDNA, sequenciamento de nova geração, pirosequenciamento em larga escala, eletroforese em gel com gradiente desnaturante, eletroforese em gel com gradiente de temperatura e hibridização de ácidos nucleicos usando sondas (PEDROSO, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aves, Manejo e Tratamentos

O estudo foi conduzido na ESALQ/USP em Piracicaba – SP, sendo que, a primeira etapa, foi realizada nas instalações do aviário do Departamento de Zootecnia, e a segunda etapa, (análises moleculares) foi realizada no Departamento de Ciência dos Solos. Para o período experimental de 1 a 42 dias, foram alojados 45 pintinhos machos da linhagem Cobb 500 por boxe experimental, em um total de 1620 aves. As aves foram inicialmente separadas por faixas de peso, em seguida distribuídas entre os boxes, de forma que o peso das unidades experimentais fosse o mais homogêneo possível. O programa nutricional foi composto por quatro rações experimentais, destinadas às diferentes fases de criação das aves: pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (7 a 21 dias de idade), crescimento (21 a 35 dias de idade) e final (35 a 42 dias de idade) (Tabela 1). Para cada fase foi formulada uma dieta basal, à base de milho e farelo de soja, de acordo com os níveis recomendados pelas Tabelas Brasileiras, para frangos machos de potencial elevado (Tabela 1) (ROSTAGNO et al., 2011). As rações foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental, na forma farelada. As rações experimentais foram produzidas utilizando o conceito *over the top*, que consistiu em utilizar uma ração basal única, garantindo-se não haver qualquer diferença entre as rações experimentais, à qual foi suplementado o aditivo utilizado para constituir a ração experimental.

Tabela 1: Composição das dietas basais

Ingredientes	Fases			
	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	48,59	53,32	56,48	60,31
Farelo de soja	43,30	40,00	35,31	31,88
Óleo de soja	3,46	3,92	4,81	4,80
Fosfato bicálcico	1,86	1,53	1,31	1,10
Calcário calcítico	0,91	0,95	0,89	0,80
Sal comum	0,51	0,48	0,46	0,44
MHA ¹	0,45	0,40	0,38	0,34
L-Lisina HCl	0,14	0,15	0,15	0,16
L-Treonina	0,04	0,04	0,03	0,03
Suplemento vitamínico ²	0,10	0,10	0,08	0,06
Suplemento mineral ³	0,05	0,05	0,05	0,05
Cloreto de colina (60%)	0,08	0,08	0,06	0,04
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição calculada				
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2.960	3.050	3.150	3.200
Proteína Bruta (%)	23,80	22,00	20,58	19,34
Ca (%)	0,92	0,84	0,76	0,66
P disponível (%)	0,47	0,40	0,35	0,31
Na (%)	0,22	0,21	0,20	0,19
Met digestível (%)	0,63	0,58	0,54	0,51
Met + cis digestível (%)	0,95	0,88	0,83	0,77
Lisina digestível (%)	1,32	1,22	1,13	1,06
Treonina digestível (%)	0,86	0,79	0,74	0,69

¹Metionina hidroxi-análoga

²Composição por kg de produto: Vit. A – 10.000 UI; Vit. D3 – 3.000 UI; Vit. E - 40 UI; Vit. K3 - 3 mg; Vit. B1 – 2 mg; Vit. B2 - 6 mg; Vit. B6 - 4 mg; Vit. B12 - 20 µg; Ácido Nicotínico - 40 mg; Ácido Pantotênico - 12 mg; Biotina - 0,15 mg; Ácido Fólico - 1 mg; Selênio - 0,25 mg.

³Composição por kg de produto: Manganês - 80 mg; Ferro - 50 mg; Zinco - 50 mg; Cobre - 10 mg; Cobalto - 1 mg; Iodo - 1 mg

Desta forma, foram utilizadas somente duas rações, dieta controle e dieta com probiótico como aditivo. Durante todo o período experimental, não foram utilizados anticoccidianos e promotores de crescimento nas dietas (apenas os tratamentos com probióticos). O probiótico utilizado foi composto por esporos vivos de bactérias (*Bacillus subtilis* C-3102, DSM15554 e FERM BP- 1096), na concentração de 10^{11} UFC/g. A dosagem do produto comercial foi de 30 gramas por tonelada de ração durante todo o período de criação. Até os 21 dias de idade as aves foram submetidas a apenas dois tratamentos (dietas experimentais), sendo que os quatro tratamentos foram estabelecidos após a aplicação da antibioticoterapia.

A antibioticoterapia foi realizada com BMD (bacitracina metileno dissacilato) na dosagem de 200 ppm (efeito em bactérias Gram-positivas) e sulfato de neomicina na dosagem de 1000 ppm (efeito em bactérias gram-negativas) na água de bebida, de 21 aos 24 dias de idade. Os dois antibióticos foram diluídos em um mesmo recipiente e administrados por três dias consecutivos via água de bebida (Figura 1). Para o fornecimento dos antibióticos via água, foram instalados bebedouros do tipo calha em cada boxe experimental aos 20 dias de idade. Durante este período de tratamento, foram suspensos todos os bebedouros pendulares. Com o objetivo de obter condições homogêneas em todo o lote, também foram instalados bebedouros do tipo calha para o fornecimento de água nos demais boxes (que não foram medicados). O tratamento com a medicação antibiótica foi uma medida para provocar efeitos negativos sobre a microbiota intestinal. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado com 2 tratamentos e 18 repetições no período de 1 a 21 dias de idade, e 4 tratamentos e 9 repetições de 22 a 42 dias, obedecendo a esquema fatorial 2×2 (com e sem probiótico na dieta $\times$ com e sem antibioticoterapia via água de bebida). Desta forma, as aves dos tratamentos que continham a dieta com probiótico receberam o aditivo desde o primeiro dia de vida. Ao final da antibioticoterapia (aos 24 dias) os bebedouros pendulares foram novamente instalados nos boxes e os bebedouros tipo calha foram retirados.

Os tratamentos foram:

T1 - DB sem probiótico / sem antibioticoterapia

T2 - DB + probiótico / sem antibioticoterapia

T3 - DB sem probiótico / antibioticoterapia aos 21, 22 e 23 dias de idade

T4 - DB + probiótico / antibioticoterapia aos 21, 22 e 23 dias de idade

Figura 1 - Aves recebendo antibioticoterapia em bebedouros tipo calha

Os dados de desempenho foram estatisticamente analisados pelo procedimento ANOVA do SAS e as comparações de médias dos fatores principais e dos eventuais desdobramentos das interações foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2 Análise da microbiota intestinal

3.2.1 Preparo das amostras

Aos 2, 4 e 6 dias após o término da antibioticoterapia, isto é, aos 26, 28 e 30 dias de idade, três aves por parcela (sendo três repetições por tratamento a cada coleta) foram selecionadas sem jejum prévio, sacrificadas por deslocamento cervical e o trato gastrintestinal foi exposto. O intestino delgado e os cecos das aves foram retirados e imediatamente congelados. Posteriormente, as amostras foram descongeladas em laboratório e os conteúdos do intestino delgado e dos cecos das aves foram coletados integralmente. Em seguida foram feitos “pools” dos conteúdos do intestino delgado e do ceco das três aves de cada unidade experimental, representando uma repetição de cada tratamento. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e novamente congeladas a -20 °C para posterior análise da microbiota intestinal. O material para estudo da microbiota intestinal obedeceu ao esquema fatorial 2×2×3 (com e sem probiótico × com e sem antibioticoterapia × tempo de coleta após antibioticoterapia).

3.2.2 Preparo do pélete bacteriano

Para análise da microbiota do conteúdo do intestino delgado, inicialmente realizou-se a concentração da fração bacteriana das amostras, de acordo com metodologia (adaptada) proposta por Apajalahti et al. (1998). O protocolo utilizado foi o seguinte: em uma seringa estéril de 60 mL, cujo êmbolo foi removido, foi construída uma coluna para filtração, composta de papel filtro qualitativo número 1 na parte inferior, algodão estéril na porção intermediária e duas camadas de gaze na porção superior. Essa coluna foi inserida em uma garrafa autoclavada de 100 mL apropriada para uma centrifugação refrigerada (Figura 2). Posteriormente, 15 g de conteúdo do intestino delgado, previamente homogeneizado, foram diluídos em 50 mL de SPB 50 mM (buffer de fosfato de sódio pH 8), contendo 0,1% de Tween 80. A mistura foi vagarosamente homogeneizada e adicionada na coluna para filtração. A garrafa contendo a coluna com a amostra foi centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos, a 4 °C. Esta coluna funcionou como um filtro, onde ficaram retidas as impurezas da amostra, como ração não digerida (Figura 2). O conteúdo foi filtrado e as bactérias concentraram-se no fundo da garrafa, na forma de pélete. O líquido remanescente foi então cuidadosamente descartado e o pélete ressuspensionado em 1 mL de solução salina estéril (solução NaCl 0,9%). Esta solução foi distribuída em eppendorfs de 1,5 mL, no volume máximo de 200 µL por tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7500 rpm por 10 minutos. Novamente o pélete bacteriano precipitou no fundo do tubo e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. O pélete bacteriano restante foi pesado e ressuspensionado em Solução Peptone (1% peptone, 15% de glicerol em água) em proporção 1:10. Essa suspensão foi homogeneizada até não restar mais pélete visível e o líquido ficar turvo e então foi congelada a -20 °C para posterior extração do DNA. O conteúdo cecal, com maior concentração de micro-organismos, foi apenas diluído em Solução Peptone na proporção de 1:10. Este processo foi realizado no laboratório de Genética da ESALQ.

Figura 2 A) Coluna de filtragem na centrífuga; B) Coluna após o processo de filtragem

3.2.3 Extração do DNA das amostras do conteúdo intestinal

A metodologia utilizada para a extração do DNA bacteriano foi baseada em Lu et al. (2003). As análises moleculares foram realizadas no Departamento de Ciência dos Solos, no Laboratório de Microbiologia Molecular. As amostras previamente processadas foram descongeladas e homogeneizadas em vortex. Foram pipetados 500 μ L da suspensão e colocou-se em um novo eppendorf, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado, ficando o pélete bacteriano aderido no fundo do eppendorf. Para a lise mecânica das células bacterianas, o pélete foi diluído em 250 μ L da solução do “bead” (Kit Mo Bio Ultra Clean Soil DNA isolation). Em seguida, foram adicionados nos tubos 60 μ L da solução S1 e 200 μ L da solução IRS (kit Mo Bio Ultra Clean Soil DNA isolation). A mistura foi agitada em vortex por 40 minutos. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 100 rpm por 30 segundos. O líquido foi então transferido para outro eppendorf, no qual foram adicionados 25 μ L da solução SDS (10%) e 2,5 μ L de proteinase K (segunda lise através da quebra enzimática). A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos e em seguida novamente centrifugada, sendo que o precipitado foi descartado. As amostras foram tratadas duas vezes com volume idêntico de fenol-clorofórmio-isoamil álcool (25:24:1) e uma vez com clorofórmio-isoamil-álcool (24:1). Após cada tratamento, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. Ao final do último tratamento, adicionaram-se 8 μ L de RNase (Roche-RNase –DNA free) e a

solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Ao final da incubação, a solução contendo o DNA foi lavada com 250 µL de isopropanol, centrifugada e o sobrenadante descartado. O DNA total que concentrou-se no fundo do eppendorf foi lavado duas vezes com álcool etílico 70 e 100%, respectivamente. Ao final do processo, o DNA do pool do intestino delgado foi ressuspensionado em 20 µL de água molecular e o DNA do conteúdo cecal foi ressuspensionado em 50 µL de água molecular (Nuclease Free Water). O DNA foi armazenado por uma noite a 4 °C para hidratar e posteriormente congelado a -20 °C. O resultado das extrações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido glacial, 1 mM EDTA), sendo aplicados 5 µL do produto de DNA extraído e posteriormente corado em solução de brometo de etídeo.

3.2.4 Estrutura da comunidade bacteriana por T-RFLP

3.2.4.1 Amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Para as reações de amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*, foram utilizados os primers universais 8fm (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 926 R (CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT) (SCHÜTTE et al., 2009). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do primer 8fm foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). No estudo da comunidade bacteriana, a metodologia de *fingerprinting* utilizada foi a Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) da região 16S rRNA. A reação de amplificação foi uma mistura de 3 µL da suspensão de DNA, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 0,05 µL de cada primer a 0,2 pmol, PCR buffer 1X, 0,01 µL de Taq DNA polimerase 0,02 U e água pura (Mili-Q) esterilizada para volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 95 °C por 4 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB, utilizando como padrão molecular 6 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente a fotografia foi documentada.

3.2.4.2 Purificação dos Produtos da PCR

Após a amplificação, as amostras foram purificadas em placa de 96 poços (Micro Amp, Applied Biosystems) adicionando-se as reações 200 µL de isopropanol e incubadas por 2 horas a -20 °C. O produto foi centrifugado a 4000 rpm por 90 minutos seguido de descarte do sobrenadante e *spin* com a placa invertida para completa eliminação de reagentes aderidos na placa. Logo após, 250 µL de etanol absoluto foi adicionado nas amostras e centrifugado a 4000 rpm por 90 minutos. O sobrenadante foi descartado e seguido de um novo *spin* com a placa invertida. A secagem das placas foi realizada a 45°C por 15 minutos. O produto purificado foi então ressuspendido em 25 µL de água esterilizada e quantificado em gel de agarose 1,5%.

3.2.4.3 Reação de restrição dos Produtos de PCR para análise de T-RFLP

A clivagem com a endonuclease HhaI foi realizada com 10 µL do produto de amplificação e com 5 unidades da enzima nas condições descritas pelo fabricante (ANGEL et al., 2010).

3.2.4.4 Precipitação dos Produtos de Digestão

Após a reação de restrição, os produtos digeridos foram precipitados para análise de fragmentos no sequenciador automático. Para precipitação foram adicionados 2 µL de EDTA 125 mM, 3 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol 100%. A placa com as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2000 × g por 45 minutos, o sobrenadante descartado e seguido de um *spin* com a placa invertida a 185 × g por 1 minuto. O volume de 70 µL de álcool 70% foi adicionado nas amostras seguido de centrifugação a 1650 × g por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e a placa invertida para centrifugação a 185 × g durante 1 minuto. Finalmente o sobrenadante foi eliminado e o precipitado seco foi armazenado em freezer a -20 °C até posterior utilização. Este material foi então analisado em sequenciador automático ABI Life 3500 (Applied Biosystems), utilizando matriz azul e o marcador padrão LIZ 600.

3.2.4.5 Análise dos dados de T-RFLP

A leitura dos eletroferogramas foi realizada no programa GENE Mapper® 4.1, onde foram considerados os parâmetros alelos, tamanho, altura e área dos picos, ajustados com o padrão GS600LIZ e diferenciados os grupos a uma distância de 0,5 de base. A obtenção dos dados de T-RFLP originou uma matriz de 72 amostras e 621 picos observados.

Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico PAST (HAMMER et al., 2001). Para caracterizar os perfis entre os grupos bacterianos de cada amostra dos segmentos do intestino das aves em função dos fatores em estudo, os dados da matriz de TRFs foram transformados Log (C+1) e submetidos a uma análise de coordenadas principais (PCoA) para detecção das dissimilaridades dos perfis bacterianos das amostras (RAMETTE et al., 2007) segundo o algoritmo de Bray-Curtis.

3.2.5 Quantificação de *Bacteria* através da PCR em tempo real

As análises da PCR em tempo real foram realizadas para quantificação do gene 16S rRNA de bactérias das amostras do conteúdo intestinal dos segmentos do ceco e intestino delgado. As reações foram realizadas em duplicata no equipamento *Rotor Gene 6000* (Corbett Life Science, Austrália), disponível no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Ciência dos Solos. O sistema de detecção utilizado foi por Syber Green I. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas em volume de 10 µL contendo 5 µL do kit *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG kit* (Invitrogen, Brasil), 1 µL de cada primer a 10 nm, 1 µL de DNA e 2 µL de água MiliQ. As amplificações do fragmento do gene 16S rRNA de bactérias foram feitas com os primers P1(5'-CCT ACG GGA GGC AGCAG-3') e P2 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (MUYZER et al., 1993) através de uma desnaturação inicial a 95 °C por 15 segundos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto.

A obtenção dos dados foi feita através do *software Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65* (Corbett) que calcula os valores de *cycle threshold* (Ct), a correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras, além da eficiência da reação (E).

Para a quantificação, a curva padrão para *Bacteria* foi determinada e foi o ponto inicial para cálculo da quantificação do gene nas amostras, sendo que os valores de Cts obtidos para cada amostra em cada uma das quantificações foram utilizados para determinar a quantidade absoluta do DNA alvo nas amostras.

Na análise estatística desta técnica, foi considerado também o fator segmento do intestino para análise conjunta com os demais fatores. Os dados da qPCR foram submetidos à análise de variância para um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2×2×3 utilizando-se o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System, 2009).

3.2.6 Sequenciamento

As amostras foram submetidas ao sequenciamento através da plataforma de nova geração MiSeq™ System (Illumina) realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ. A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada, utilizando um mix de 4 *primers forward* e um mix de 4 *primers reverse* (Tabela 2). Esta mistura contém pré-adaptadores que possibilitam amostrar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro da amostra analisada. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos a 95 °C por 45 segundos; 57 °C por 1 minuto e 45 segundos e 72 °C por 1 minuto. A extensão final foi conduzida por 72 °C por 4 minutos. Para a reação utilizaram-se 2,5 µL de 10X PCR Buffer; 1,5 µL de MgCl₂ 50mM; 2 µL de dNTP's 2,5 mM; 0,3 µL de Taq Polimerase 5U/µL; 0,1 µL de cada mix de *primer* (Tabela 2); 1 µL de DNA e água Mili-Q para completar 25 µL do volume da reação. O produto da reação foi purificado com o Kit *Charge Switch*, de acordo com instruções do fabricante. Após a purificação, realizou-se a segunda PCR para ligação dos adaptadores (*index*). Cada amostra sequenciada recebeu um par de *index* distinto para identificação da origem de cada uma das sequências obtidas. As condições da reação foram: 95 °C por 3 minutos, seguindo 5 ciclos de 95 °C por 30 segundos; 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 5 minutos. Os reagentes desta PCR foram similares aos da reação anterior, com exceção da adição do mix de primers em que foi modificado pela adição de 5 µL de cada adaptador (2 adaptadores para cada amostra), além da inclusão de 15

µL do produto da primeira PCR, completando um volume final de 50 µL. O produto foi mantido a -20 °C até o momento do sequenciamento.

As análises de bioinformática foram realizadas através do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) conforme procedimentos descritos por Carvalho (2014).

Tabela 2 -Mix de primers utilizado na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal

Primers	Sequência 5'→3'
16SV4FPCR1_1 F	5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_2 F	5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_3 F	5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_4 F	5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGNNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4RPCR1_1 R	5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATA AGAGACAGCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_2 R	5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATA AGAGACAGNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_3 R	5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_4 R	5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNNCCGTCAATTCMTTTRAGT

Os índices de riqueza e diversidade (índice de Shannon Weaver) foram calculados com os resultados do sequenciamento através do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), utilizando o comando (alpha_diversity.py).

Em todas as classificações taxonômicas e para todos os grupos analisados foi verificada a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Os grupos que não atenderam as premissas da normalidade e da homogeneidade da variância foram transformados em raiz quadrada (variável +1).

Os grupos transformados e não transformados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias dos efeitos principais e dos eventuais desdobramentos das interações foi realizado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do PROC MIXED do SAS.

4 RESULTADOS

4.1 Desempenho

Os resultados de desempenho das aves apresentados de 1 a 21 dias de idade são referentes somente aos tratamentos dietéticos (DB e DB + probiótico). Os resultados dos efeitos de todos os tratamentos experimentais foram obtidos somente após os 21 dias de idade, isto é, após a antibioticoterapia.

Na fase pré-inicial, não foi verificada diferença estatística no desempenho das aves alimentadas com ração sem e com adição do probiótico, sendo que o peso dos pintos aos 7 dias foi de 183 g, o ganho de peso, 141 g, o consumo de ração, 153 g e a conversão alimentar, 1,090, em média. Entretanto, no período de 1 a 21 dias (Tabela 3), foi observado maior ganho de peso (GP) e peso vivo (PV) ($P < 0,05$) das aves suplementadas com probiótico em relação àquelas sem suplementação. Não houve diferença no consumo de ração (CR), na conversão alimentar (CA) ou na viabilidade (VB) nesse período.

Tabela 3 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de acordo com os tratamentos

	PV	GP	CR	CA	VB
Dieta Basal (DB)	1033 ^b	990 ^b	1315	1,328	99,35
DB + Probiótico	1045 ^a	1002 ^a	1322	1,319	98,71
Valor de P	0,04	0,04	0,23	0,14	0,19
CV	1,66	1,73	1,40	1,31	1,45

¹Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Médias ($p < 0,05$)

No período de 1 a 28 dias, o qual inclui a semana que se sucede ao início da antibioticoterapia, não houve interação entre os fatores probiótico e antibioticoterapia para as variáveis de desempenho (Tabela 4). Entretanto, o fator principal probiótico influenciou o GP e PV ($P < 0,05$), e melhores resultados foram obtidos pelas aves alimentadas com rações com inclusão de probiótico, independente de as aves serem ou não submetidas ao tratamento com antibiótico. Por outro lado, o fator principal antibioticoterapia ($P < 0,05$) possibilitou a melhoria da CA das aves, independente da presença ou ausência de probiótico nas dietas.

No período de 1 a 35 dias de idade também não foi detectada interação entre os fatores probiótico e antibioticoterapia para as variáveis de desempenho estudadas. O fator principal probiótico afetou as variáveis GP, PV, CR e CA ($P < 0,05$), sendo que ocorreu melhoria em todas as características de desempenho das aves suplementadas com probiótico na dieta, independentemente de as aves serem ou não submetidas à antibioticoterapia (Tabela 5).

No período total de criação, 1 a 42 dias de idade, não foi observada interação entre os fatores bem como efeito dos fatores principais no desempenho das aves ($P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 4 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 28 dias submetidos aos tratamentos sem (-P) ou com (+P) probiótico na dieta e sem (-A) ou com (+A) antibioticoterapia

Tratamentos		GP (g)	PV (g)	CR(g)	CA(g)	VB (%)
-P-A		1674	1631	2309	1,416	99,01
+P-A		1697	1653	2340	1,416	97,78
-P+A		1678	1634	2306	1,413	97,53
+P+A		1704	1661	2320	1,397	98,77
CV		2,25	2,28	1,71	1,16	2,44
Causas de Variação	GL	Valor de P				
Probiótico(P)	1	0,044	0,050	0,079	0,146	1,0
Antibioticoterapia (A)	1	0,651	0,650	0,375	0,042	0,746
Interação PB x AN	1	0,819	0,886	0,509	0,152	0,111
Fatores Principais						
Probiótico	Sem	1632 ^b	1676 ^b	2307	1,414	98,27
	Com	1657 ^a	1700 ^a	2330	1,407	98,27
Antibioticoterapia	Sem	1642	1686	2325	1,416 ^b	98,40
	Com	1647	1691	2314	1,405 ^a	98,15

¹Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias ($P < 0,05$)

Tabela 5 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 35 dias submetidos aos tratamentos sem (-P) ou com (+P) probiótico na dieta e sem (-A) ou com (+A) antibioticoterapia

Tratamentos		GP (g)	PV (g)	CR(g)	CA(g)	VB (%)
-P-A		2235	2301	3482	1,559	98,52
+P-A		2332	2378	3581	1,536	97,41
-P+A		2246	2297	3474	1,546	96,67
+P+A		2293	2341	3496	1,525	98,10
CV		1,62	2,27	2,02	1,66	2,74
Causas de Variação	GL	Valor de P				
Probiótico(P)	1	0,001	0,0003	0,029	0,027	0,872
Antibioticoterapia (A)	1	0,495	0,148	0,091	0,226	0,561
Interação PB x NA	1	0,193	0,243	0,153	0,922	0,212
Fatores Principais						
Probiótico	Sem	2240 ^b	2299 ^b	3477 ^b	1,553 ^b	97,59
	Com	2313 ^a	2359 ^a	3538 ^a	1,530 ^a	97,75
Antibioticoterapia	Sem	2283	2339	3531	1,547	97,96
	Com	2270	2319	3485	1,536	97,38

^aMédias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias (P < 0,05)

Tabela 6 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias submetidos aos tratamentos sem (-P) ou com (+P) probiótico na dieta e sem (-A) ou com (+A) antibioticoterapia

Tratamentos		GP (g)	PV (g)	CR(g)	CA(g)	VB (%)
-P-A		2957	3000	4829	1,634	97,29
+P-A		3009	3054	4946	1,644	95,56
-P+A		2963	3004	4836	1,632	95,80
+P+A		2963	3010	4824	1,628	97,78
CV		2,35	2,47	2,42	1,07	3,51
Causas de Variação	GL	Valor de P				
Probiótico(P)	1	0,341	0,252	0,238	0,622	0,484
Antibioticoterapia (A)	1	0,468	0,447	0,198	0,202	0,888
Interação PB x NA	1	0,347	0,357	0,155	0,280	0,485
Fatores Principais						
Probiótico	Sem	2960	3002	4833	1,633	96,48
	Com	2986	3032	4885	1,636	97,41
Antibioticoterapia	Sem	2983	3027	4888	1,639	97,03
	Com	2963	3007	4830	1,630	96,85

4.2 Terminal Restriction Length Polymorphism (T-RFLP)

Através dos agrupamentos da PCoA (Figura 3) foi observado que as comunidades bacterianas do conteúdo do intestino delgado e do ceco separam-se, com algumas pequenas sobreposições de grupos.

Figura 3 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos perfis relativos às comunidades bacterianas dos conteúdos do intestino delgado e ceco

A estrutura bacteriana do intestino delgado e do ceco aos 26, 28 e 30 dias de idade (2, 4 e 6 dias após a antibioticoterapia) foi avaliada pela análise da PCoA (Figuras 4 e 5). Através desta análise, observou-se que, de modo geral, os fatores probiótico e antibioticoterapia isolados ou combinados, assim como a idade (tempo após a antibioticoterapia), modulam a microbiota intestinal de forma independente.

Na análise de T-RFLP do intestino delgado aos 28 e 30 dias, houve falha em algumas amostras, portanto comprometendo a apresentação de todas as repetições e a interpretação completa destes resultados.

Analisando os agrupamentos da PCoA do conteúdo do intestino delgado, observa-se que a microbiota das aves dos dois tratamentos com antibioticoterapia (sem ou com probiótico) apresenta maior proximidade comparativamente à dos demais tratamentos; este resultado ocorreu em todas as idades estudadas (Figura 4).

Os pontos da PCoA também são indicativos que ocorreu separação da estrutura bacteriana das aves do tratamento controle (aves não suplementadas com probiótico e não medicadas) em relação às aves suplementadas com probiótico (Figura 4).

Em relação a PCoA construída com a estrutura bacteriana representativa do conteúdo do ceco, foi possível observar que aos 26 dias (2 dias após a antibioticoterapia) apenas um tratamento (+P-A) distanciou-se dos demais, sendo que os outros três apresentaram proximidade entre si. Desta forma, aos 26 dias, as comunidades bacterianas referentes às aves dos tratamentos controle, do tratamento terapêutico e tratamento dietético e terapêutico apresentaram alta similaridade. (Figura 5). O maior agrupamento dos perfis bacterianos em função dos tratamentos ocorreu com o decorrer do tempo, sendo este agrupamento mais evidente aos 28 e 30 dias de idade. Além disso, observou-se que com a progressão do tempo após a antibioticoterapia, houve aumento na similaridade da comunidade bacteriana do ceco das aves dos dois tratamentos que receberam probiótico (+P-A e +P+A), ao passo que as comunidades dos tratamentos que não receberam probiótico (-P-A e -P+A) mantiveram-se distanciadas. (Figura 5).

A

B

Figura 4 - PCoA da comunidade bacteriana do conteúdo do intestino delgado das aves de acordo com os os tratamentos; A) 26 dias, B)28 dias e C) 30 dias de idade

Figura 5 - PCoA da comunidade bacteriana do conteúdo do ceco das aves de acordo com os os tratamentos; A) 26 dias, B)28 dias e C) 30 dias de idade

Para melhor visualização da estrutura das comunidades em função da idade, foi realizada a análise temporal individual dos tratamentos (Figura 6 e 7). A estrutura da microbiota do conteúdo do intestino delgado e do ceco foi modificada a cada amostragem; este efeito ocorreu em todos os tratamentos, inclusive no tratamento controle (sem probiótico e sem antibioticoterapia). No conteúdo do intestino delgado, observa-se que, de modo geral, os perfis bacterianos correspondentes às idades de 28 e 30 dias apresentaram maior similaridade entre si, com maior separação em relação as comunidades bacterianas aos 26 dias (Figura 6). Em contrapartida, os pontos da PCoA das comunidades do conteúdo do ceco apontam que a microbiota das aves aos 26 e 28 dias possuem similaridade entre si e distanciam-se da estrutura bacteriana aos 30 dias de idade (Figura 7).

Figura 6 - Estrutura da microbiota do conteúdo do intestino delgado aos 2, 4 e 6 dias após a antibioticoterapia (26, 28 e 30 dias de idade) em função dos tratamentos: A) -P-A; B) +P-A; C) -P+A; D) +P+A

Figura 7 - Estrutura da microbiota do conteúdo do ceco aos 2, 4 e 6 dias após a antibioticoterapia (26, 28 e 30 dias de idade) em função dos tratamentos: A) -P-A; B) +P-A; C) -P+A; D) +P+A

4.3 Quantificação de bactérias através de qPCR

A técnica de PCR em tempo real permitiu a quantificação do domínio *Bacteria* do conteúdo do intestino delgado e do ceco das aves independente de cultivo (Tabela 5). O valor médio de cópias do gene 16S rRNA por grama de conteúdo foi de $7,10 \times 10^9$ para o intestino delgado e $1,30 \times 10^{11}$ para o ceco.

Não houve interação ou efeito dos fatores principais probiótico e antibioticoterapia no número de cópias do gene 16S rRNA ($P>0,05$) (Tabela 7). No entanto, foi detectada interação entre os fatores idade e segmento do intestino das aves ($P<0,05$) para esta mesma variável. Desdobrando-se a interação, verificou-se maior abundância do número de cópias do gene 16S rRNA no conteúdo do ceco em relação ao número de cópias do gene no conteúdo do intestino delgado aos 26 dias ($P<0,05$) (Tabela 8), enquanto que aos 28 e 30 dias o número de cópias do gene foi semelhante entre as amostras do conteúdo do intestino delgado e do ceco ($P>0,05$).

No conteúdo do intestino delgado o número de cópias do gene 16S rRNA não foi modificado nas 3 diferentes idades ($p>0,05$), entretanto, para o conteúdo do ceco, foi verificada uma redução progressiva na abundância de bactérias nos dias que sucederam o final da antibioticoterapia, de 26 a 30 dias de idade ($P<0,05$) (Tabela 8).

Tabela 7 - Quantificação da região 16S rRNA de acordo com os fatores probiótico, antibioticoterapia e idade e suas possíveis interações

Cópias de 16S rRNA por grama de conteúdo		
Fatores Principais		
Probiótico	Sem	$6,27 \times 10^{10}$
	Com	$6,71 \times 10^{10}$
Antibiótico	Sem	$5,98 \times 10^{10}$
	Com	$7,00 \times 10^{10}$
Idade	26 dias	$1,85 \times 10^{11}$
	28 dias	$5,46 \times 10^9$
	30 dias	$3,47 \times 10^9$
Segmento do Intestino	ID	$7,10 \times 10^9$
	Ceco	$1,30 \times 10^{11}$
CV		89,05
Valor de P		
Probiótico (P)		NS
Antibioticoterapia (A)		NS
Idade (I)		0,0002
Segmento do Intestino (SI)		0,0001
P × A		NS
I × SI		0,0004
I × P × A		NS
SI × P × A		NS

NS: não significativo

Tabela 8 - Desdobramento da interação entre idade da coleta e segmento do intestino das aves

Segmento	Idade		
	26 dias	28 dias	30 dias
Intestino Delgado	$1,13 \times 10^9$ Ba	$1,04 \times 10^9$ Aa	$2,22 \times 10^9$ Aa
Ceco	$3,70 \times 10^{11}$ Aa	$1,19 \times 10^{10}$ Ab	$9,18 \times 10^9$ Ac

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

4.4 Sequenciamento

A comparação taxonômica da microbiota intestinal referente aos diferentes tratamentos foi estudada considerando a classificação no nível de filo, ordem e gênero. Os grupos taxonômicos detectados em prevalência inferior a 0,1% não foram apresentados. Os principais filos encontrados no conteúdo do intestino delgado foram Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e Tenericutes, com frequência de cerca de 99%, cujos valores estão apresentados na Tabela 9. As frequências de bactérias dos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes no conteúdo do intestino delgado não foram afetadas pelo probiótico, pela antibioticoterapia ou pela idade. No entanto, houve interação entre probiótico e antibioticoterapia para as frequências de Firmicutes e Tenericutes no conteúdo do intestino delgado.

Desdobrando-se a interação (Tabela 10), observa-se que o probiótico promoveu um aumento na frequência de Firmicutes na ausência de antibioticoterapia, mas não houve aumento quando foi aplicada a antibioticoterapia. De maneira oposta, o probiótico causou redução de Tenericutes nas aves não medicadas, mas não nas submetidas à antibioticoterapia, uma vez que Tenericutes já havia sido reduzido pela antibioticoterapia isoladamente (Tabela 10).

Tabela 9 - Frequência (%) dos filos no conteúdo do intestino delgado das aves de acordo com os tratamentos

		F	A	P	B	T
Fatores Principais						
Probiótico	Sem	88,17	5,31	2,11	1,44	1,94
	Com	90,39	6,42	1,75	0,40	0,58
Antibioticoterapia	Sem	90,11	4,41	1,97	1,25	1,70
	Com	88,44	7,31	1,89	0,61	0,83
Idade						
	26	87,92	6,04	2,22	1,21	2,0
	28	91,67	5,83	1,67	0,16	0,25
	30	88,25	5,71	1,88	1,42	1,50
Valor de P						
P		0,25	0,44	0,38	0,19	0,13
A		0,39	0,06	0,84	0,29	0,34
I		0,22	0,98	0,50	0,38	0,18
P×A		0,04	0,73	0,74	0,10	0,04
P×I		0,78	0,78	0,66	0,97	0,63
A×I		0,86	0,51	0,88	0,98	0,96
P×A×I		0,77	0,14	0,69	0,39	0,42

F: Firmicutes; A: Actinobacteria, P: Proteobacteria, B: Bacteroidetes, T: Tenericutes

*Diferença estatística significativa, (P<0,05)

Tabela 10 - Desdobramento da interação entre probiótico e antibioticoterapia para os filos Firmicutes e Tenericutes do conteúdo do intestino delgado dos frangos de corte

Antibioticoterapia		
		Com
Probiótico	Sem	Firmicutes
Sem	87,00 ^B	89,33
Com	93,22 ^A	87,56
Tenericutes		
		Com
Sem	3,22 ^{Aa}	0,67 ^b
Com	0,17 ^B	1,0

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

No conteúdo do ceco das aves os mesmos cinco filos foram prevalentes, com frequência de cerca de 96%, cujos valores estão apresentados na Tabela 11. Não foi detectada interação ou efeito principal dos fatores dietético e terapêutico nas porcentagens de Actinobacteria e Proteobacteria. Por outro lado, houve efeito significativo (P<0,05) do fator antibioticoterapia na abundância de Tenericutes no conteúdo intestinal. O tratamento terapêutico reduziu a abundância do filo

Tenericutes no conteúdo do ceco das aves, independente da presença ou ausência de probiótico dietético ou da idade estudada. Para as porcentagens dos filos Firmicutes e Bacteroidetes no conteúdo do ceco, ocorreu interação entre probiótico dietético, terapia com antibiótico e idade (tempo após a antibioticoterapia) ($P < 0,05$).

Desdobrando-se a interação, observa-se que aos 28 dias, e não nas demais idades, foi encontrado um aumento de Firmicutes com antibioticoterapia sem probiótico na ração, enquanto os níveis se mantiveram elevados nos tratamentos com probiótico. A interação tripla para Bacteroidetes ocorreu em sentido inverso ao ocorrido para Firmicutes: aos 28 dias, mas não nas demais idades, foi encontrada uma redução de Bacteroidetes com antibioticoterapia sem probiótico na ração, enquanto os níveis foram igualmente baixos com probiótico na ração (Tabela 12).

Tabela 11 - Frequência (%) dos filos no conteúdo do ceco das aves de acordo com os tratamentos

		F	A	P	B	T
Fatores Principais						
Probiótico	Sem	84,42	1,03	1,03	2,86	7,08
	Com	86,58	0,61	1,81	2,11	5,19
Antibioticoterapia	Sem	82,44	1,08	1,17	2,92	7,94 ^a
	Com	88,56	0,55	1,67	2,05	4,33 ^b
Idade	26	86,67	0,83	1,50	1,83	4,25
	28	83,17	1,08	1,54	4,0	7,17
	30	86,67	0,54	1,21	1,63	7,0
Valor de P						
P		0,23	0,29	0,06	0,59	0,09
A		<0,01	0,18	0,28	0,43	<0,01
I		0,22	0,55	0,68	0,09	0,06
P×A		0,03	0,61	0,99	0,01	0,36
P×I		0,07	0,36	0,64	0,06	0,54
A×I		0,11	0,36	0,35	0,39	0,45
P×A×I		0,03	0,81	0,09	0,02	0,15

^aMédias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste F ($P < 0,05$)

F: Firmicutes; A: Actinobacteria, P: Proteobacteria, B: Bacteroidetes, T: Tenericutes

Tabela 12 - Desdobramento da interação dos fatores dietético (probiótico), terapêutico (antibiótico) e idade (tempo após a antibioticoterapia) para os filos Firmicutes e Tenericutes do conteúdo do ceco dos frangos de corte

Probiótico		Sem		Com	
Antibioticoterapia		Sem	Com	Sem	Com
Firmicutes					
Idade	26	82,67	93,33	82,67	88,00
	28	69,00 ^b	89,67 ^a	87,50 ^a	86,50 ^{ab}
	30	86,50	85,33	86,33	88,50
Bacteroidetes					
	26	1,0 ^B	1,33	2,33	2,67
	28	9,5 ^{Aa}	2,0 ^b	1,0 ^b	3,5 ^{ab}
	30	2,0 ^B	1,33	1,67	1,5

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

As principais ordens encontradas no conteúdo do intestino delgado foram Actinomycetales, Bacillales, Lactobacillales, Clostridiales, Erysipelotrichales e Bacteroidales, perfazendo 94 a 97% do total das ordens (Tabela 13). Na classificação filogenética ordem das bactérias do conteúdo do intestino delgado, não foi observada interação significativa dos fatores em estudo ($P > 0,05$) na abundância dos grupos no conteúdo do intestino delgado (Tabela 13), por outro lado, foram obtidos efeitos dos fatores principais antibioticoterapia e idade das aves ($P < 0,05$).

A antibioticoterapia resultou no aumento da abundância das ordens Actinomycetales e Lactobacillales e causou redução da incidência dos grupos da ordem Clostridiales, independente do efeito dos demais fatores. Com o tempo após a antibioticoterapia (de 2 para 4 dias), houve aumento da ordem Lactobacillales e redução na porcentagem da ordem Clostridiales no conteúdo do intestino delgado das aves, mas no sexto dia após a medicação os valores foram intermediários (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência (%) das ordens predominantes no conteúdo do intestino delgado das aves de acordo com os tratamentos

		A	B	L	C	E	B
Fatores Principais							
Probiótico	Sem	5,19	3,11	58,28	23,69	2,19	1,44
	Com	6,36	2,17	70,56	16,56	0,63	0,42
Antibiótico	Sem	4,31 ^b	2,39	58,11 ^b	27,25 ^a	1,58	1,25
	Com	7,25 ^a	2,89	70,72 ^a	13,0 ^b	1,25	0,61
Idade	26	5,88	2,46	52,33 ^b	30,04 ^a	2,13	1,21
	28	5,83	2,17	75,08 ^a	13,54 ^b	0,42	0,17
	30	5,63	3,29	65,83 ^{ab}	16,79 ^{ab}	1,71	1,42
Valor de P							
P		0,42	0,29	0,06	0,12	0,12	0,19
A		0,05	0,58	0,05	<0,01	0,69	0,29
I		0,99	0,58	0,02	0,01	0,35	0,38
P×A		0,81	0,95	0,09	0,22	0,28	0,10
P×I		0,80	0,65	0,85	0,94	0,92	0,97
A×I		0,50	0,49	0,52	0,16	0,85	0,98
P×A×I		0,11	0,49	0,09	0,06	0,57	0,39

A: Actinomycetales, B: Bacillales, L: Lactobacillales, C: Clostridiales, E: Erysipelotrichales, B: Bacteroidales

¹Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de médias ($P < 0,05$)

As principais ordens encontradas no conteúdo do ceco foram Bacillales, Lactobacillales, Clostridiales, Erysipelotrichales e Bacteroidales, perfazendo 84 a 90% do total das ordens (Tabela 14).

Houve interação significativa dos fatores probiótico, antibioticoterapia e idade na abundância de Bacteroidales; assim como houve efeito significativo ($P < 0,05$) dos fatores principais probiótico, antibioticoterapia e idade nas concentrações de Lactobacillales e Erysipelotrichales no conteúdo do ceco ($P < 0,05$).

A porcentagem de Lactobacillales no ceco aumentou em aves submetidas ao tratamento terapêutico ($P < 0,05$), acompanhando o efeito no intestino delgado (Tabela 14). Por outro lado, a concentração das bactérias pertencentes à ordem Erysipelotrichales reduziu aos 28 e 30 dias em relação aos 26 dias ($P < 0,05$).

Desdobrando-se a interação, observa-se que aos 28 dias, mas não nas demais idades, foi encontrado uma redução de Bacteroidales com antibioticoterapia sem probiótico na ração, enquanto os níveis se mantiveram baixos nos tratamentos com probiótico (Tabela 15).

Tabela 14 - Frequência (%) das ordens predominantes no conteúdo do ceco das aves de acordo com os tratamentos

		B	L	C	E	B
		Fatores Principais				
Probiótico (P)	Sem	3,11	16,75	60,94	3,67	2,27
	Com	2,17	18,06	61,86	3,69	2,11
Antibioticoterapia (A)	Sem	2,39	11,67 ^b	64,42	3,69	2,33
	Com	2,89	23,14 ^a	58,39	3,67	2,05
Idade (I)	26	2,46	14,17	61,75	4,75 ^a	1,83
	28	2,17	18,21	60,13	3,12 ^b	3,13
	30	3,29	19,83	62,33	3,16 ^b	1,63
		Valor de P				
P		0,58	0,92	0,87	0,96	0,59
A		0,20	0,04	0,29	0,96	0,42
I		0,63	0,74	0,94	0,04	0,09
P×A		0,85	0,99	0,35	0,96	0,01
P×I		0,52	0,2	0,12	0,57	0,06
A×I		0,97	0,74	0,54	0,84	0,38
P×A×I		0,44	0,16	0,57	0,64	0,02

B: Bacillales, L: Lactobacillales, C: Clostridiales, E: Erysipelotrichales, B: Bacteroidales

¹Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo de médias (p< 0,05)

Tabela 15 - Desdobramento da interação dos fatores dietético (probiótico), terapêutico (antibiótico) e idade (tempo após a antibioticoterapia) para a ordem Bacteroidales no conteúdo do ceco

Probiótico		Sem		Com	
Antibioticoterapia		Sem	Com	Sem	Com
Idade	26	1,0 ^A	1,33	2,33	2,67
	28	6,0 ^{Ba}	2,0 ^{ab}	1,0 ^b	3,5 ^{ab}
	30	2,0 ^{AB}	1,33	1,67	1,5

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

Em relação à classificação filogenética gênero, os grupos predominantes detectados no conteúdo do intestino delgado das aves foram *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, *Pseudomonas* e *Escherichia*, os quais encontram-se na Tabela 16. Não houve diferença estatística na porcentagem de *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Escherichia* no conteúdo do intestino das aves (P>0,05). Houve interação significativa dos fatores probiótico, antibioticoterapia e idade na abundância de *Lactobacillus* e *Faecalibacterium* (P<0,05), assim como houve interação dos fatores antibioticoterapia e idade na porcentagem de *Streptococcus* identificada no conteúdo do intestino delgado (P<0,05).

Desdobrando-se a interação tripla para *Lactobacillus*, ocorreu uma tendência geral de aumento na prevalência deste gênero com a idade para todos os tratamentos com exceção do tratamento controle; entretanto, nas aves controle também ocorreu esse aumento aos 28 dias mas aos 30 dias houve retorno à prevalência anterior (Tabela 17). A concentração de bactérias do gênero *Lactobacillus* foi duplicada entre 26 e 30 dias de idade no intestino delgado das aves que não foram suplementadas com probiótico e foram submetidas à antibioticoterapia ($P<0,05$) (Tabela 17). O aumento de *Lactobacillus* de 26 para 30 dias de idade foi aproximadamente 4 vezes em aves não medicadas mas alimentadas com dietas com probiótico ($P<0,05$).

A interação tripla para *Faecalibacterium* no intestino delgado é descrita por uma redução em sua prevalência aos 26 dias de idade quando as aves receberam probiótico e antibioticoterapia, ao passo que aos 30 dias ocorreu redução nas aves com probiótico e não medicadas.

Desdobrando-se a interação entre antibioticoterapia e idade para a porcentagem de *Streptococcus* no conteúdo do intestino, observa-se que aos 26 dias (2 dias após o tratamento), a abundância deste gênero aumentou 4 vezes em aves tratadas com antibiótico, mas aos 28 e aos 30 dias os valores voltaram a ser semelhantes aos das aves não medicadas ($P<0,05$) (Tabela 18).

Tabela 16 - Frequência dos gêneros predominantes no conteúdo do intestino delgado das aves de acordo com os tratamentos

		L	S	Str	F	P	E
Fatores Principais							
Probiótico	Sem	49,39	1,02	6,28	1,81	0,22	0,50
	Com	48,69	1,86	10,0	1,50	0,33	0,50
Antibioticoterapia	Sem	43,58	1,19	6,13	1,94	0,19	0,39
	Com	54,50	1,69	10,0	1,36	0,36	0,61
Idade							
	26	27,88	1,71	12,04	2,25	0,42	0,70
	28	62,17	1,29	9,83	0,45	0,12	0,38
	30	57,08	1,33	2,54	2,25	0,29	0,41
Valor de P							
P		0,92	0,19	0,25	0,40	0,44	0,88
A		0,11	0,43	0,086	0,79	0,29	0,46
I		<0,01	0,82	<0,01	0,03	0,54	0,81
P×A		0,18	1,0	0,43	0,81	0,54	0,63
P×I		0,40	0,96	0,06	0,32	0,19	0,92
A×I		0,89	0,66	0,01	0,63	0,90	0,53
P×A×I		0,03	0,40	0,07	0,02	0,90	0,57

L: *Lactobacillus*, S: *Staphylococcus*, Str: *Streptococcus*, F: *Faecalibacterium*, P: *Pseudomonas*, E: *Escherichia*

*Diferença estatística significativa, (P<0,05)

Tabela 17 - Desdobramento da interação dos fatores dietético (probiótico), terapêutico (antibiótico) e idade (tempo após a antibioticoterapia) para os gêneros *Lactobacillus* e *Faecalibacterium* no conteúdo do intestino delgado

Probiótico		Sem		Com	
Antibioticoterapia		Sem	Com	Sem	Com
<i>Lactobacillus</i>					
Idade	26	27,33 ^B	36,00 ^B	19,50 ^B	28,67 ^B
	28	66,50 ^A	65,00 ^{AB}	49,67 ^{AB}	67,50 ^A
	30	24,0 ^{Bb}	77,50 ^{Aa}	74,50 ^{Aa}	52,33 ^{ABab}
<i>Faecalibacterium</i>					
	26	2,0 ^{Ba}	2,67	4,0 ^a	0,33 ^b
	28	1,73 ^B	0,67	0,67	0,50
	30	4,5 ^{Aa}	1,0 ^{ab}	0,50 ^b	3,0 ^{ab}

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

Tabela 18 - Desdobramento da interação dos fatores terapêutico (antibiótico) e tempo (idade) para o gênero *Streptococcus* no conteúdo do intestino delgado

<i>Streptococcus</i>		
Idade	Antibioticoterapia	
	Sem	Com
26	4,58 ^b	19,50 ^a
28	11,58	8,08
30	2,25	2,83

*Letras diferentes em (minúscula) na mesma (linha) denotam diferença estatística

Os gêneros detectados em maiores proporções no conteúdo do ceco foram *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Oscillospira*, os quais estão apresentados na Tabela 19. Não houve diferença estatística nas porcentagens de *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* e *Oscillospira* no conteúdo cecal ($P > 0,05$). Houve efeito do fator principal antibioticoterapia na porcentagem de *Lactobacillus* no conteúdo do ceco ($P < 0,05$), assim como interação dos fatores probiótico, antibioticoterapia e idade na abundância de *Bacteroides* no ceco ($P < 0,05$).

As aves que receberam o tratamento terapêutico apresentaram aumento na porcentagem de *Lactobacillus* no conteúdo do ceco ($P < 0,05$); este efeito ocorreu independente dos fatores probiótico e idade das aves (Tabela 19).

Desdobrando-se a interação tripla para *Bacteroides*, verifica-se que aos 28 dias os tratamentos com probiótico ou antibiótico resultaram em redução na abundância desse gênero no ceco, enquanto nos demais dias os níveis já eram baixos. No tratamento controle houve aumento em *Bacteroides* apenas aos 28 dias de idade mas não nos demais dias, sendo que nos demais tratamentos os níveis se mantiveram baixos (Tabela 20).

Tabela 19 - Frequência dos gêneros predominantes no conteúdo do ceco das aves de acordo com os tratamentos

		L	S	F	B	R	O
Fatores Principais							
Probiótico	Sem	10,94	4,64	9,42	1,0	2,86	1,72
	Com	13,25	4,11	9,36	0,5	3,19	1,78
Antibioticoterapia	Sem	7,08	3,64	10,22	0,90	2,89	1,89
	Com	17,11	5,11	8,56	0,55	3,17	1,61
Idade							
	26	7,33	4,83	9,75	0,5	2,50	1,33
	28	13,33	4,17	8,71	1,38	3,21	1,67
	30	15,63	4,13	9,71	0,38	3,38	2,25
Valor de P							
P		0,75	0,67	0,98	0,04	0,47	0,88
A		0,05	0,24	0,40	0,09	0,55	0,47
I		0,36	0,85	0,88	<0,01	0,63	0,14
P×A		0,74	0,18	0,67	0,04	0,24	0,32
P×I		0,31	0,63	0,92	<0,01	0,13	0,75
A×I		0,72	0,12	0,95	0,39	0,36	0,75
P×A×I		0,14	0,71	0,66	<0,01	0,76	0,98

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

L: *Lactobacillus*; S: *Streptococcus*; F: *Faecalibacterium*; B: *Bacteroides*, R: *Ruminococcus*, O: *Oscillospira*

Tabela 20 - Desdobramento da interação dos fatores dietético (probiótico), terapêutico (antibiótico) e tempo (idade) para o gênero *Bacteroides* no conteúdo do ceco

<i>Bacteroides</i>					
Probiótico		Sem		Com	
Antibioticoterapia		Sem	Com	Sem	Com
Idade	26	0,33 ^B	0,33	0,67	0,67
	28	3,5 ^{Aa}	1,0 ^b	0,68 ^b	1,0 ^b
	30	0,5 ^B	0,33	0,68	0,65

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

Os índices de riqueza e diversidade de bactérias do conteúdo intestinal foram calculados e estão apresentados na Tabela 21.

No conteúdo do intestino delgado não foi detectada diferença estatística para os índices de riqueza e diversidade ($P > 0,05$). Em contrapartida, observa-se que houve uma tendência de interação entre os fatores probiótico e antibioticoterapia no índice de diversidade bacteriana ($P = 0,054$) (Tabela 21). Essa tendência de interação indica que a antibioticoterapia provocou redução da diversidade na ausência de

probiótico mas aumento da diversidade quando os frangos tinham probiótico na dieta.

De maneira geral os índices de riqueza e diversidade bacteriana encontrados no ceco (Tabela 22) foram maiores que aqueles do intestino delgado. Houve interação significativa dos fatores probiótico e antibioticoterapia ($P < 0,05$) e efeito principal da idade ($P < 0,05$) para os índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do ceco.

Houve um claro efeito da idade das aves na redução da riqueza e diversidade bacteriana cecal, independentemente de tratamentos. Aos 28 e 30 dias, a riqueza e a diversidade de bactérias no conteúdo do ceco foram semelhantes entre si e menores que aos 26 dias de idade das aves ($P < 0,05$) (Tabela 22).

A riqueza e diversidade bacteriana no ceco foram mais elevadas no tratamento controle do que nos demais, que receberam probiótico ou antibioticoterapia. A antibioticoterapia, em aves que não foram suplementadas com probiótico provocou a redução dos índices de riqueza e diversidade no conteúdo do ceco ($P < 0,05$), mas não naquelas que receberam probiótico, uma vez que o tratamento apenas com probiótico já causou diminuição nessas características (Tabela 23).

Tabela 21 - Índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do intestino delgado de acordo com os tratamentos

Tratamentos		Riqueza	H'
26 dias			
-P-A		928	6,14
+P-A		585	4,40
-P+A		1054	5,43
+P+A		657	4,86
28 dias			
-P-A		903	5,02
+P-A		768	4,60
-P+A		687	4,47
+P+A		871	4,80
30 dias			
-P-A		998	5,83
+P-A		820	4,84
-P+A		792	4,39
+P+A		1130	6,22
Fatores Principais			
Probiótico	Sem	894,11	5,22
	Com	805,44	4,96
Antibioticoterapia	Sem	833,92	5,14
	Com	865,64	5,03
Idade (dias)	26	806,42	5,21
	28	807,63	4,72
	30	935,00	5,32
Valor de P			
P		0,30	0,50
A		0,70	0,77
I		0,37	0,39
P×A		0,13	0,054
P×I		0,08	0,27
A×I		0,72	0,99
P×A×I		0,40	0,51

H': Índice de Shannon Weaver

Tabela 22 - Índices de riqueza e diversidade bacteriana no conteúdo do ceco de acordo com os tratamentos

Tratamentos		Riqueza	H'
26 dias			
-P-A		7012	10,48
+P-A		4989	9,14
-P+A		4141	8,48
+P+A		4807	9,36
28 dias			
-P-A		5019	9,34
+P-A		1413	6,59
-P+A		1987	6,57
+P+A		4472	8,94
30 dias			
-P-A		2016	7,54
+P-A		2426	7,34
-P+A		2026	7,46
+P+A		1619	6,28
Fatores Principais			
Probiótico	Sem	3700	8,31
	Com	3287	7,94
Antibioticoterapia	Sem	3812	8,40
	Com	3175	7,85
Idade	26	5237 ^a	9,36 ^a
	28	3223 ^b	7,86 ^b
	30	2022 ^b	7,15 ^b
Valor de P			
P		0,49	0,44
A		0,30	0,25
I		0,0008*	0,023*
P×A		0,039*	0,035*
P×I		0,88	0,89
A×I		0,54	0,83
P×A×I		0,10	0,059

H': Índice de Shannon Weaver

¹Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste F (P< 0,05)

Tabela 23 - Desdobramento da interação dos fatores dietético (probiótico) e terapêutico (antibiótico) nos índices de riqueza e diversidade no conteúdo do ceco dos frangos de corte

Riqueza		
Probiótico	Antibioticoterapia	
	Sem	Com
Sem	4682 ^{Aa}	2718 ^b
Com	2943 ^B	3633
H'		
	Sem	Com
Sem	9,12 ^{Aa}	7,50 ^b
Com	7,69 ^B	8,20

*Letras diferentes em maiúscula (minúscula) na mesma coluna (linha) denotam diferença estatística

5 DISCUSSÃO

A antibioticoterapia é, em diversas situações, uma medida terapêutica indispensável na produção de frangos de corte, sendo de grande importância para o combate de doenças provocadas por micro-organismos. O tratamento com antibiótico é utilizado não somente para o combate de infecções intestinais, mas também infecções sistêmicas. A utilização de antibióticos como medida terapêutica frequentemente causa distúrbios na microbiota intestinal de humanos (VAN DER WAAIJ; NORD, 2000; LINDBERG et al., 2004). Com o avanço das técnicas moleculares, é possível melhor compreensão e análise das mudanças que ocorrem na comunidade intestinal. Existe um número expressivo de pesquisas que relatam os efeitos da antibioticoterapia na microbiota intestinal de humanos; entretanto, não existem estudos que demonstrem estes resultados na microbiota intestinal de frangos de corte, bem como a associação destes efeitos com o desempenho das aves. Nós acreditamos que a adição de probiótico na dieta das aves pode recuperar a disbiose provocada pela antibioticoterapia na microbiota. Em vista disto, este trabalho torna-se pioneiro na descrição dos efeitos da antibioticoterapia associada à utilização de probiótico dietético na microbiota intestinal e desempenho das aves.

O melhor desempenho obtido pelas aves suplementadas com probiótico neste estudo foi coerente com muitos trabalhos que relatam os efeitos positivos de probiótico nas características produtivas (GEIER et al., 2009; ZANG; KIM, 2014). O aumento no ganho de peso e peso vivo das aves alimentadas com dietas com inclusão do probiótico está provavelmente associado aos diversos efeitos benéficos do aditivo descritos na literatura tais como redução de bactérias patogênicas no intestino, melhoria do status imunológico, produção de substâncias bactericidas e bacteriostáticas no intestino, modulação da expressão gênica, entre outros. Neste estudo, o efeito positivo do probiótico no desempenho das aves aos 28 e 35 dias de idade pode estar associado às mudanças que a proliferação do probiótico (*Bacillus subtilis*) no intestino provoca na estrutura da microbiota intestinal (Figuras 4 e 5). Observa-se que o agrupamento da PCoA referente à comunidade bacteriana das aves alimentadas com probiótico foi distinta dos agrupamentos dos demais tratamentos, em todas as idades estudadas. O probiótico dietético reduziu o número de OTUs da comunidade bacteriana do conteúdo do ceco e, conseqüentemente, os índices de riqueza e diversidade. Provavelmente, esta redução no número de OTUs

da microbiota intestinal na presença do probiótico observada neste estudo está atrelada à redução de bactérias patogênicas em detrimento da proliferação de bactérias benéficas no intestino.

Em relação ao período total de criação (1 a 42 dias de idade), não foi detectado o efeito do probiótico no desempenho das aves assim como ocorreu nas demais fases de criação. Possivelmente, o efeito do probiótico seja de maior impacto na microbiota nas fases de criação inicial e de crescimento, período em que a microbiota ainda não está completamente estabelecida.

O probiótico, assim como a antibioticoterapia, provocaram mudanças na estrutura da microbiota intestinal e essas alterações são confirmadas pelas modificações nas distribuições taxonômicas dos grupos bacterianos do conteúdo do intestino. Os dois fatores em estudo quando utilizados isoladamente provocaram mudanças na microbiota intestinal na mais alta classificação taxonômica de bactérias (filó). O tratamento dietético (probiótico), assim como o tratamento terapêutico, aumentou a concentração de Firmicutes e reduziu a concentração de Tenericutes em relação à dieta controle (sem probiótico e sem antibioticoterapia) no conteúdo do intestino. Além do mais, o probiótico também diminuiu a abundância de Bacteroidetes no intestino. Resultados semelhantes foram relatados por Videnska et al. (2013) que afirmaram que a concentração de Bacteroidales decresce no intestino de poedeiras submetidas a terapia com antibiótico. Embora o probiótico tenha demonstrado efeitos positivos no desempenho das aves neste estudo, assim como provocado o decréscimo de Bacteroidales no intestino, Al-Sheikly e Al-Saieg (1980) relataram que membros do gênero *Bacteroides* podem ser benéficos para o hospedeiro, haja vista que as bactérias pertencentes a este grupo apresentam alta atividade hidrolítica. Os membros deste gênero estão entre os grupos mais efetivos em degradar carboidratos indigestíveis, incluindo polissacarídeos não amiláceos e celulose. O propionato é produzido pelo *Bacillus fragilis*, sendo este ácido de cadeia curta essencial para a saúde do hospedeiro (CHOCT et al., 1996).

Sing et al. (2014) também observaram que os grupos Proteobacteria e Tenericutes foram os filos detectados em maiores porcentagens no intestino de frangos de corte, entretanto, em nossa pesquisa, também observamos alta incidência do filo Actinobacteria. Firmicutes é o filo predominante no intestino das aves (ZHU et al., 2012) e nele estão contidas as grandes classes de importância na

saúde intestinal de frangos de corte como Bacilli e Clostridia. Em humanos, as diferentes abundâncias de Firmicutes no intestino estão atreladas a mudanças na obtenção de energia pelo hospedeiro, sendo Firmicutes o grupo dominante em indivíduos obesos (LEI et al., 2006). Os resultados obtidos neste estudo também concordam com os trabalhos de Cui et al. (2013) com suínos e de Zhao et al. (2013) com frangos de corte. Nestas pesquisas, além da redução de Bacteroidetes e aumento de Firmicutes no intestino dos animais suplementados com probiótico, também foi demonstrado efeito do aditivo no metabolismo energético do hospedeiro, como por exemplo, o estímulo da lipogênese.

Assim como houve efeito dos fatores no nível taxonômico mais elevado, também detectamos efeito do probiótico e da antibioticoterapia no nível de gênero. Os fatores dietético e terapêutico quando utilizados isoladamente ou quando associados, aumentaram a concentração de *Lactobacillus* e reduziram a concentração de *Faecalibacterium* no intestino em relação ao tratamento controle. Comparativamente aos nossos resultados, Singh et al. (2012) observaram maior concentração do filo Tenericutes e do gênero *Faecalibacterium* no intestino de frangos de corte de pior conversão alimentar em relação a aves de boa conversão alimentar. À semelhança deste estudo, Videnska et al. (2013) também detectaram aumento de *Lactobacillus* no intestino de poedeiras medicadas com tetraciclina e estreptomicina. Este aumento de *Lactobacillus* foi associado a maior resistência à antibioticoterapia das bactérias deste gênero.

Os *Lactobacillus* são bactérias Gram-negativas, não patogênicas e amplamente utilizadas como probióticos (BRISBIN et al., 2011). Possivelmente, o efeito positivo do probiótico em relação à dieta controle no desempenho das aves observado neste estudo esteja associado ao aumento da concentração de *Lactobacillus* no conteúdo intestinal. A porcentagem de *Lactobacillus* no intestino de aves suplementadas com probiótico foi o dobro da porcentagem detectada em aves que foram somente medicadas e 4 vezes superior em relação as aves do tratamento controle (Tabela 17). De modo complementar, Angelakis, Raoult (2010) observaram que aves inoculadas com *Lactobacillus* (4×10^{10}) aos 4 dias de idade, apresentaram maior ganho de peso em relação às aves do tratamento controle (sem inóculo de *Lactobacillus*).

Embora não tenha ocorrido prejuízo no desempenho das aves quando submetidas à antibioticoterapia, observamos que o tratamento terapêutico modula a

microbiota intestinal de forma independente. O tratamento terapêutico reduziu a concentração de Clostridiales no intestino. Na ordem Clostridiales está contido o gênero *Clostridium* que é de grande interesse na avicultura. Aves infectadas com *Clostridium perfringens* podem desenvolver enterite necrótica, que é uma enfermidade que causa grandes prejuízos econômicos na produção avícola. As concentrações do gênero *Clostridium* foram detectadas em quantidades ínfimas neste estudo e por este motivo não foram analisadas. A medicação também provocou o aumento de *Streptococcus* e redução de *Faecalibacterium* e *Bacteroides*. Considerando o desempenho das aves aos 28 dias, que foi o registro com maior proximidade da idade em que as aves foram submetidas à antibioticoterapia (21 dias), observamos que as aves medicadas não tiveram um prejuízo drástico no desempenho como era esperado neste estudo. Aliás, a conversão alimentar das aves medicadas foi melhor em relação às aves do tratamento controle (sem probiótico e sem antibiótico). Possivelmente, as alterações que o tratamento terapêutico provocou na microbiota intestinal das aves não foram drásticas o suficiente para causarem impactos negativos no seu desempenho. Provavelmente, a diferença dos efeitos negativos da antibioticoterapia na microbiota de aves observada neste estudo e os efeitos na microbiota de humanos relatada em diversos estudos é devido a grande diferença na composição da microbiota das duas espécies, diversidade encontrada e produção de ácidos graxos no trato gastrointestinal (LEI et al., 2012). Por outro lado, podemos especular que a antibioticoterapia não tenha sido drástica o suficiente. De acordo com Plummer et al. (2005), a intensidade da disbiose provocado pela antibioticoterapia depende da natureza do antibiótico, da taxa de absorção, da rota de eliminação e potencial de degradação enzimática. Além disso, obter conclusões plausíveis sobre os efeitos da antibioticoterapia na microbiota é difícil devido à complexidade dos componentes da mesma (LEVY, 2000).

Embora a antibioticoterapia não tenha afetado o número de OTUs no conteúdo do intestino delgado (riqueza), assim como o índice de diversidade, observamos que o tratamento terapêutico reduziu os índices de riqueza e diversidade da comunidade intestinal do conteúdo do ceco dos frangos de corte. Esta redução no número de OTUs na microbiota intestinal de aves expostas a antibioticoterapia já era esperado e também observado por outros autores.

Nos dois segmentos do intestino estudados, observamos uma transição dos perfis bacterianos com a idade (tempo após a antibioticoterapia). Entretanto, é importante também considerar que houve mudanças na estrutura da microbiota intestinal assim como alterações nos índices de *Lactobacillus* no conteúdo do intestino das aves do tratamento controle (sem probiótico e sem antibioticoterapia). Este resultado provavelmente evidencia que a microbiota intestinal é dinâmica, e pode ser modificada no intervalo de 2 dias.

A transição na estrutura bacteriana com a idade detectada através do T-RFLP no intestino delgado, para todos os tratamentos, possivelmente está relacionada ao aumento da porcentagem de Lactobacillales e redução de Clostridiales que ocorreu de 26 para 30 dias de idade. Entretanto, estas mudanças não acarretaram mudança no número de cópias de 16S rRNA, e portanto não acarretam mudança no número de OTUs identificados (índices de riqueza e diversidade bacteriana) do conteúdo do intestino delgado. A mudança temporal que ocorre na estrutura bacteriana do conteúdo do ceco está relacionada à redução progressiva no número de cópias do gene 16S rRNA, assim como com a redução nos índices de riqueza e diversidade observados.

Considerando que o perfil bacteriano do conteúdo do ceco das aves suplementadas com probiótico aproxima-se do perfil detectado nas aves alimentadas com dietas com probiótico e medicadas aos 30 dias (6 dias após o final da antibioticoterapia), assim como as diversas mudanças na microbiota detectadas com o tempo e as porcentagens intermediárias de alguns grupos no intestino das aves medicadas e suplementadas com probiótico em relação aos grupos observados nos demais tratamentos, é possível especular-se a ocorrência da recuperação da microbiota dos animais que foram submetidos a antibioticoterapia e suplementados com probiótico. Videnska et al. (2013) observaram total recuperação da microbiota intestinal de poedeiras, 12 dias após a antibioticoterapia.

Fazendo uma análise comparativa dos dados gerados pelas diferentes técnicas moleculares utilizadas neste estudo, verificamos que alguns resultados foram divergentes. A quantificação do número de cópias de 16S rRNA do conteúdo do intestino delgado e do ceco obtidos com a qPCR produziu resultados semelhantes àqueles obtidos através da estimativa dos índices de riqueza e diversidade observados pela técnica de sequenciamento. Ambos os resultados demonstraram que o número dos grupos de bactérias no intestino delgado não se

modifica com a idade no conteúdo do intestino delgado, mas, no conteúdo do ceco ocorre uma redução progressiva na concentração de micro-organismos em função do tempo. Em contrapartida, os resultados no número de cópias de 16S rRNA observadas para conteúdo do intestino delgado e conteúdo do ceco diverge dos resultados obtidos através do sequenciamento. Os resultados da qPCR apontam que não houve diferença estatística no número de cópias de 16S rRNA entre bactérias do conteúdo do intestino delgado e ceco. Entretanto, observamos pela técnica de sequenciamento, que o número de OTUs no conteúdo do ceco é bem mais elevado que no conteúdo do intestino delgado. Embora a técnica de qPCR faça uma quantificação numérica e o sequenciamento seja uma quantificação relativa, nós sabemos que a população no ceco é bem mais expressiva que no conteúdo do intestino delgado.

6 CONCLUSÕES

O desempenho superior de frangos de corte suplementados com probiótico, associado às mudanças que o aditivo provocou na estrutura da comunidade bacteriana do intestino, como aumento de *Lactobacillus*, redução de Clostridiales e do número de OTUs, foram fatores indicativos que o probiótico provoca o aumento de bactérias benéficas e reduz as bactérias patogênicas no conteúdo intestinal.

A antibioticoterapia modula a estrutura da microbiota intestinal de frangos de corte, entretanto, as mudanças provocadas no perfil bacteriano não foram negativas o suficiente para causar queda no desempenho das aves.

Aos 6 dias após a antibioticoterapia, as aves submetidas ao tratamento terapêutico e ao probiótico dietético apresentaram microbiota intestinal com maior similaridade à microbiota das aves que receberam dietas com probiótico, sendo este, provavelmente, indicativo da recuperação da comunidade bacteriana do intestino.

REFERÊNCIAS

- ABILDGAARD, L.; HOJBERG, O.; SCHRAMM, A.; BALLE, K.M.; ENGBERG, R.M. The effect of feeding a commercial essential oil product on *Clostridium perfringens* numbers in the intestine of broiler chickens measured by real-time PCR targeting the ϵ -toxin-encoding gene (*plc*). **Animal Feed Science and Technology**, The Netherlands, v. 157, p. 181-189, 2010.
- ABT, M.C.; ARTIS, D. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. **Current Opinion in Gastroenterology**, Riverwoods, v.25, p. 496–502, 2009.
- ANGEL, R.; ASAF, L.; RONEN, Z.; NEJIDAT, A. Nitrogen transformations and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in a desert ephemeral stream receiving untreated wastewater. **Microbial Ecology**, New, York, v. 59, p. 46-58, 2010.
- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. **Plos One**, São Francisco, v. 5, n. 5, p. 1-5, 2010.
- ANTONOPOULOS, D.A.; HUSE, S.M.; MORRISON, H.G.; SCHMIDT, T.M.; SOGIN, M.L.; YOUNG, V.R. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infection and Immunity**, Washington, v.77, n.6, p. 2367-2375, 2009.
- APAJALAHTI, J.H.A.; SARKILAHTI, L.K.; HEIKKINEN, J.P.; NYRMINEN, P.H.; HOLBEN, W.E. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanosine-plus-cytosine based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p. 4084-4088, 1998.
- APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, Champaign, v. 60, p. 223-232, 2004.
- APPELT, M.D.; NUNES, R. V.; POZZA, P.C.; SILVA, W.T. M.; VENTURI, I.; NUNES, C.G.V. Níveis de probiótico em rações de origem animal e vegetal para frangos de Corte, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.4, p.765-771, 2010.
- ARAUJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L.; LIMA, M.R.; LI, A, C.B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **ACTA Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.1, n.3, 2007.
- BELENGUER, A.; DUNCAN, S.H.; CALDER, A.G.; HOLTROP, G.; LOUIS, P.; LOBLEY, G.E.; FLINT, H.J. . Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3593-3599, 2006.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de Monogástricos**. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 303p.

BILLOO, A.G.; MEMON, M.A.; KHASKHELI, S.A.; MURTAZA, G.; IGBAL, K.; SAEED SHEKHANI, M.; SIDDIGI, A. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. **World's Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 12, n. 28, p. 4557-4560, 2006.

BRISBIN, J.T.; GONG, J.; OROUJI, S.; ESUFALI, J.; MALLICK, A.I.; PARVIZI, P.; SHEWEN, P.E.; SHARIF, S. Oral treatment of chickens with Lactobacilli influences elicitation of immune responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, n. 9, p. 1447-1455, 2011.

CARVALHO, P.A. Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem. 2014, 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CHOCT, M.; HUGHES, R.J.; WANG, J.; BEDFORD, M.R.; MORGAN, A.J.; ANNISON, G. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. **British Poultry Science**, London, v.37, n.3, p. 609-621, 1996.

CRESSMAN, M.D.; YU, Z.; NELSON, M.C.; MOELLER, S.J.; LILBURN, M.S.; ZERBY, H.N. Interrelations between the Microbiotas in the Litter and in the Intestines of Commercial Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 19, p. 6572–6582, 2010.

CUI, C.; SHEN, C.J.; JIA, G.; WANG, K.N. Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1766-1776, 2013.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The pervasive effects of antibiotics on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **Plos Biology**, Cambridge, v. 6, p. 2383-2400, 2008.

DHAMA, K., SINGH, S.D. Probiotics improving poultry health and production: an overview. **Poultry Punch**, New Delhi, v. 26, n.3, p. 41, 2010.

DHAMA, K.; VERMA, V.; SAWANT, P.W.; TIWARI, R.; VAID, R. K.; CHAUHAN, R.S. Applications of Probiotics in Poultry: Enhancing immunity and beneficial effects on production performances and health – A review. **Journal of Immunology and Immunopathology**, New Delhi, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2011.

DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D.A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, p. 4554-4561, 2011.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 5, p. 75-97, 2003.

FRITTS, C.A.; KERSEY, J.H.; MOTL, M.A.; KROGER, E.C.; YAN, F. SI, J.; JIANG, Q.; CAMPOS, M.M.; WALDROUP, A.L.; WALDROUP, P.W. Bacillus subtilis C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, v. 9, n. 2, p.149-155, 2000.

FULLER, R. Microbial activity in the alimentary tract of birds. **Proceedings of the Nutrition Society**, Dublin, v. 43, p. 55-61, 1984.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: **Probiotics – The Scientific Basis**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 1-398.

FURUSE, M.; YOKOTA, H. Effect of the gut microflora on the size and weight of organs of chicks fed diets of different protein content. **British Poultry Science**, London, v. 25, p.429-439, 1984.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 15-28, 2010.

GEIER, M.S., V.A. TOROK, G.E. ALLISON, K. OPH EL-KELLER, R.J. HUGHES. Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but not influence the performance of broiler chickens. **Journal Applied Microbiology**, Washington ,v. 106, p. 2540-1548, 2009.

GEIER, M.S.; MIKKELSEN, L.L.; TOROK, V.A.; ALLISON, G.E.; OLNOOD, C.G.; BOULIANNE, M.; HUGHES, R.J.; CHOCT, M. Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 109, p.1329–1338, 2010.

GONG, J.; FORSTER, R.J.; YU, H. CHAMBERS, J. R.; SABOUR, P. M.; WHEATCROFT, R.; CHEN, S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiology Letters** , The Netherlands, v. 208, p. 1-7, 2002.

HALLER, D.; BODE, C.; HAMMES, W.P. Cytokine secretion by stimulated monocytes depends on the growth phase and heat treatment of bacteria: a comparative study between lactic acid bacteria and invasive pathogens. **Microbiology Immunology**, v. 43, p. 925-935, 1999.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: **Paleontologia Eletrônica**, New York, v.4, p.9, 2001.

HANAMANTA, N.; NARAYANA S.M.; VEENA, T.; JAYAKUMAR, K.; SWAMY, H.D.N. Effect of prebiotic and probiotic on growth performance in broiler chickens. **Indian Journal and Animal Research**, New Delhi, v.45, n.4, 271-275, 2011.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; VICENTE, J.L.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on salmonella in neonatal broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p.1662-1666, 2007.

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 29, p. 813-835, 2005.

JERNBERG, C.; LOFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. **ISME Journal**, The Netherlands, v. 1, p. 56-66, 2007.

JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: Modes of action. **World's Poultry Science Journal**, The Netherlands, v. 53, p. 351-368, 1997.

KARKOW, F. J. A.; FAINTUCH, J.; KARKOW, A.G.M. Probióticos: perspectivas médicas. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 51, n. 1, p. 38-48, 2007.

KIEN, C.L.; BLAUWIEKEL, R.; BUNN, J.Y.; JETTON, T.L.; FRANKEL, W.L.; HOLST, J.J. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.37, p.916-922, 2007.

LAN, P.T.; HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Phylogenetic analysis of caecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. **Microbiology Immunology**, Malden, v. 46, p. 371-382, 2002.

LAN, Y.; VERSTEGEN, M.W.A.; TAMMINGA, WILLIAMS, S.B.A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, The Netherlands, v. 61, p. 95-104, 2005.

LA-ONGKHUM, O.; PUNGSUNGVORN, N.; AMORNTHIEWAPHAT, N.; NITISINPRASERT, S. Effect of the antibiotic avilamycin on the structure of the microbial community in the jejunal intestinal tract of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 1532-1538, 2011.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; JANG, S.I.; LI, G.; LEE, S.; LILLEHOJ, E.; SIRAGUSA, G.R. Effect of Bacillus-based direct-fed microbials on Eimeria maxima infection in broiler chickens. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 33, p. 105-110, 2010.

LEI, F.; YIN, Y.; WANG, Y.; DENG, B.; YU, H.D.; LI, L.; XIANG, C.; WANG, S.; ZHU, B.; WANG, X. Higher-level production of volatile fatty acids in vitro by chicken gut microbiotas than by human gut microbiotas as determined by functional analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 5763-5772, 2012.

LEVY, S.B. Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Dallas, v. 19, p. 120-122, 2000.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, Washington, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P.J.; RAMEY, R.R.; BIRCHER, J.S.; SCHLEGEL, M.L.; TUCKER, T.A.; SCHRENZEL, M.D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, Washington, v. 320, p. 1647–1651, 2008.

LINDBERG, R.; JARNHEIMER, P.A.; OLSEN, B.; JOHANSSON, M.I.; TYSKLIND. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. **Chemosphere**, v.57, p. 1479-1488, 2004.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.

LUND, M.; BJERRUM, L.; PEDERSEN, K. Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*- and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, p. 1217-1224, 2010.

MACFARLANE, S. Antibiotics treatment and microbes in the gut. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 16, n. 4, p. 919-924, 2014.

MEIMANDIPOUR, A.; SOLEIMANI, A.F.; HOUSHMAND, M.; KASIM, A.; BEJO, M.H.; SHUHAIMI, M.; YAZID, A.M. Effects of rough handling on short chain fatty acid production and gastrointestinal pH in broilers and modulatory role of *Lactobacilli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 74, p. 17030-17037, 2011.

MUELLER, S.; SAUNIER, K.; HANISCH, C.; NORIN, E.; ALM, L.; MIDTVEDT, T.; CRESCI, A.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; VERDENELLI, M.C.; CLAVEL, T.; KOEBNICK, C.; ZUNFT, H.F.; DORÉ, J.; BLAUT, M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1027–1033, 2006.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p. 695-700, 1993.

NASTRO, L. J.; FINEGOLD, S.M. Bactericidal activity of five antimicrobials agents against *Bacteroides fragilis*. **The Journal of infectious diseases**, Cambridge, v. 126, n. 1, p.104-107, 1972

NATHAN, C. Antibiotics at the crossroads. **Nature**, Washington, v. 431, p. 899-902, 2004.

NUNES, I.J. **Nutrição animal básica**. 2. ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 387p.

OLIVEIRA, M.C.; MORAES, V.M.B. Mananoligossacarídeos e enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para aves. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.8, n.3, p.339-357, 2007.

OVIEDO-RONDÓN, E.O.; HUME, M.E.; BARBOSA, N.A.; SAKOMURA, N.K.; WEBER, G.; WILSON, J.W. Ileal and caecal microbial populations in broilers given specific essential oil blends and probiotics in two consecutive grow-outs. **Avian Biology Research**, London, v. 3, n. 4, p. 157–169, 2010.

PAZ, A. S.; ABREU, R. D.; COSTA, M.C. M.M.; JAEGER, S. M. P. L.; ROCHA, A. P.; FERREIRA, B. P.; SANTANA, R. S.; CAMPOS, B.M. Aditivos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte, **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.11, n.2, p. 395-402, 2010.

PEDROSO A.A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, M. R. The Structure of Bacterial Community in the Intestines of Newly Hatched Chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 14, p. 32–237, 2005.

PEDROSO A.A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, M. R.; RACANICCI, A.M.C.; LONGO, F.A.; SORBARA, J.O.B. Intestinal Bacterial Community and Growth Performance of Chickens Fed Diets Containing Antibiotics. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, p. 747–752, 2006.

PEDROSO, A.A. Microbiota do Trato Digestório: Transição do Embrião ao Abate. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2011, Santos. **Anais...** Campinas: Facta, 2011, p. 123-130.

PLUMMER, S.F.; GARAIOVA, I.; SHARVOTHAM, T.; COTTRELL, S.L.; SCOUILLER, S.L.; WEAVER, M.A.; TANG, J.; DEE, P.; HUNTER, J. Effects of probiotics on the composition of the intestinal of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Birmingham, v.26, p.69-74, 2005.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. **Microbial Ecology**, New York, v.53, p.197-207, 2007.

ROBINSON, C.J.; YOUNG, V.B. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, Austin, v. 1, n.4, p. 279-284, 2010.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.

SAS INSTITUTE. Statistical Analysis System: user's guide. Version 9.1 ed. Cary, 2006.

SATO, R.N.; LODDI, M.M.; NAKAGHI, L.S.O. Uso de antibiótico e /ou probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, p. 37, 2002.

SCHÜTTE, U.M.E.; ALDO, Z.; BENT, S.J.; WILLIAMS, C.J., SHNEIDER, G.M.; SOLHEIM, B.; FORNEY, L.F. Bacterial succession in a glacier foreland of the high Arctic. **The Isme Journal**, Washington, v.3, p. 1258-1268, 2009.

SEARGEANT, M.J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T.A.; BEDFORD, M.R.; PENN, C.W.; PALLAN, M.J. **PLOS ONE**, Sao Francisco, v. 9, n. 3, p. 1- 13, 2014.

WAITITU, S.M.; YITBAREK, A.; MATINI, E.; ECHEVERRY, H.; KIARIE, E.; RODRIGUEZ-LECOMPTÉ, J.C.R.; NYACHOTI, C.M. Effect of supplementing direct-fed microbials on broiler performance, nutrient digestibilities, and immune responses. **Poultry Science**, Champaign, v.93, n.3, 2014.

SEN, S.; INGALE, S.L.; KIM, Y.W.; KIM, K.H.; LOHAKARE, J.D.; KIM, E.K.; KIM, H.S.; RYU, M.H.; KWON, I.K.; CHAE, B.J. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science**, Washington, v.93, n.1, 2012.

SINGH, K.M.; SHAH, T.; DESHPANDE, S.; JAKHESARA, S. J.; KORINGA, P.G.; RANK, D.N.; JOSHI, C.G. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. **Molecular Biology Reports**, Nova York, v.39, p. 10595-10602, 2012.

SINGH, K.M.; SHAH, T.M.; REDDY, B.; DESHPANDE, S.; RANK, D.N.; JOSHI, C.G. Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 55, p. 145-154, 2014.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **SAS User's guide**: statistics. Cary: SAS Institute, 2009. (CD-ROM)

STERN, N.J.; COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BERRANG, M.E.; MUSGROVE, M.T. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens, **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 156-160, 2001.

SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C.E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 101-114, 2001.

TOURNUT, J.R. Probiotics. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35; 1998, Botucatu: **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, p. 179-199.

VAN DER WAAIJ, D.; NORD, C.E. Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. **International Journal of antimicrobial agents**, Birmingham, v. 16, p.191-197, 2000.

VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.P. Supplementation of Coated Butyric Acid in the Feed Reduces Colonization and Shedding of *Salmonella* in Poultry, **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 1851-1856, 2005.

VIDENSKA, p.; FALDYNOVA, M.; JURICOVA, H.; BABAK, V.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; RYCHILK, I. Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeat therapy with tetracycline and streptomycin. **Veterinary Research**, London, v. 9, n. 30, p. 1-9, 2013.

VILÀ, B.; FONTGIBELI, A.; BADIOLA, I.; ESTEVE-GARCIA, E.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M.; BRUFAU, J. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. toyoi inclusion in poultry feeds, **Poultry Science**, Champaign, v.88, p. 975-979, 2009.

WILLING, B.P.; VACHARAKSA, A.; CROXEN, M.; THANACHAYANONT, T.; FINLAY, B.B. Altering host resistance to infections through microbial transplantation. **PLOS ONE**, Sao Francisco, v.6, n. 10, p. 1-9, 2011.

WILLING, B.P.; RUSSELL, S.L.; FINLAY, B.B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.9, p. 233-243, 2011.

YANG, Y.; IJI, P.A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science**, The Netherlands, v. 65, p. 97-114, 2009.

ZHANG, Z.F.; KIM, I.H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal, nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding and excretas odor contents in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 93, p. 364-370, 2014.

ZHANG, L.; CAO, G.T.; ZENG, X.F.; ZHOU, L.; FERKET, P.R.; XIAO, Y.P. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. **Poultry Science**, Champaign, v.96, p. 46-53, 2014.

ZHAO, L.; WANG, G.; SIEGEL, P.; HE, C.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZHENGXIAO, Z.; TIAN, F.; JIANXIN, Z.; ZHANG, H.; ZIKUI, S.; CHEN, W.; ZHANG, Y.; MENG, H.E. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. **Scientific Report**, London, v. 3, n. 1163, p. 1-6, 2013.

ZHOU, H.; GONG, J.; BRISBIN, J.T.; YU, H.; SANEI, B.; SABOUR, P.; SHARIF, S. Appropriate Chicken Sample Size for Identifying the Composition of Broiler Intestinal Microbiota Affected by Dietary Antibiotics, Using the Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Technique. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 2541–2549, 2007.

ZHU, X.Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y.; JOERGER, R.D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 59-18-5924, 2002.