

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE *Bacteria* DO TRATO INTESTINAL DE
FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PROMOTORES DE CRESCIMENTO**

ADRIANA AYRES PEDROSO M. Sc.

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio de 2003

**ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE *Bacteria* DO TRATO INTESTINAL DE
FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PROMOTORES DE CRESCIMENTO**

ADRIANA AYRES PEDROSO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN**

Co-orientador: Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Pedroso, Adriana Ayres

Estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos
suplementados com promotores de crescimento / Adriana Ayres Pedroso.

- - Piracicaba, 2003.

103 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Antibiótico 2. Bacteria 3. Promotor de crescimento 4. Frango de
corte 5. Probiótico 6. Suplemento alimentar para animal 7. Trato
intestinal I. Título

CDD 636.513

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

À minha mãe pelo amor, apoio
incondicional e exemplo de
determinação e coragem, ofereço

A Titi, pelo afeto, presença
constante e auxílio em minha
educação, dedico

Ao meu preto,
"nada sério", com amor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, pela orientação e demonstração de paciência e compreensão durante os anos de convívio, e principalmente pelo exemplo de profissionalismo,

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, por ter disponibilizado seu laboratório, conhecimento, paciência e atenção,

A Prof. Dra. Helaine Carrer por ter aberto as portas de seu laboratório para a conclusão do trabalho,

Aos colegas de trabalho do Departamento de Produção Animal, Adriana Nogueira, Aline, Berti, Carlos, Flavio, Juliano e Liliana pela ajuda constante na condução dos experimentos de campo e amizade,

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular pelo convívio e auxílio no desenvolvimento do trabalho: Adrianinha, Büll, Daniele, Denise, Felipe, Juliano, Magneto, Simão, Suzel e Victor,

A amiga Daniely Salvador, pelas horas de conversa e atenção, a qual durante os quase 11 anos se transformou em irmã,

Aos colegas de pós-graduação, em especial a Patrícia, por fazerem com que o doutorado fosse não somente um período de crescimento profissional, mas também de crescimento pessoal.

A FAPESP, pela bolsa de estudo e recursos financeiros concedidos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
3 DESEMPENHO E MORFOMETRIA DE ÓRGÃOS DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO OU ANTIBIÓTICO E CRIADOS EM BATERIAS OU SOBRE PISO.....	8
RESUMO.....	8
SUMMARY	9
3.1 Introdução	10
3.2 Material e Métodos	12
3.3 Resultados e Discussão	15
3.4 Conclusões	21
4 ANTIBIÓTICO COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM RAÇÕES DE FRANGOS ALTERAM A COMUNIDADE BACTERIANA INTESTINAL.....	22
RESUMO.....	22
SUMMARY	24
4.1 Introdução	25

4.2 Material e Métodos	29
4.2.1 Procedimento de campo.....	29
4.2.2 Extração do DNA total	30
4.2.3 PCR.....	31
4.2.4 DGGE	31
4.2.5 Construção de bibliotecas de amplicons do rDNA 16S	32
4.2.6 Seqüenciamento de amplicons do rDNA 16S	32
4.2.7 Análise de dados.....	32
4.2.8 Processamento das seqüências.....	33
4.3 Resultados e Discussão	34
4.3.1 DGGE	35
4.3.2 Bibliotecas da região V1 - V3 do rDNA 16S	49
4.4 Conclusões	56
5 EFEITO DE PROBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM RAÇÕES DE FRANGOS NA MICROBIOTA INTESTINAL.....	
RESUMO	58
SUMMARY	59
5.1 Introdução	60
5.2 Material e Métodos	63
5.2.1 Procedimento de campo.....	63
5.2.2 Extração do DNA total	63
5.2.3 PCR.....	64
5.2.4 DGGE	65
5.2.5 Excisão dos amplicons a partir do gel de poliacrilamida	65
5.2.6 Seqüenciamento dos amplicons do rDNA 16S.....	66
5.2.7 Análise dos dados	66
5.2.8 Análise das seqüências	67
5.3 Resultados e Discussão	67

5.3.1 DGGE	68
5.3.2 Seqüenciamento dos amplicons do rDNA 16S.....	84
5.4 Conclusões.....	89
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE *Bacteria* DO TRATO INTESTINAL DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Autora: ADRIANA AYRES PEDROSO

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN

Co-orientador: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

RESUMO

O trabalho objetivou avaliar o efeito de probióticos e antibióticos utilizados como promotores do crescimento sobre o desempenho de frangos de corte e a capacidade dos agentes de alterar o ecossistema intestinal de aves criadas em baterias e sobre piso. Adicionalmente foi estudado o efeito dos probióticos sobre a presença de oocistos na cama das aves.

Os antibióticos tiveram sua eficácia, como promotores de crescimento, comprovada para aves criadas sobre piso, mas não em bateria. Foram observadas alterações na estrutura da comunidade de *Bacteria* no trato intestinal de frangos criados em baterias e sobre piso e suplementados com antibióticos.

Não houve evidência de efeito favorável dos probióticos sobre o desempenho e incidência de oocisto na cama das aves. Os probióticos não tiveram a capacidade de colonizar o epitélio intestinal de frangos de corte. Foram observadas discretas modificações na estrutura da comunidade de

Bacteria de frangos criados em bateria e sobre piso e suplementados com dietas contendo probióticos.

A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino delgado de frangos foi modificada em função do ambiente no qual frangos, suplementados com probióticos e antibióticos, foram criados.

Frangos isentos de qualquer tipo de promotor de crescimento apresentaram 15 unidades taxonômicas operacionais distintas na microbiota intestinal aderida ao epitélio, predominantemente *Lactobacillus* e *Pseudomonas*.

***Bacteria* COMMUNITY STRUCTURE OF THE INTESTINAL
TRACT OF CHICKENS SUPPLEMENTED OF GROWTH
PROMOTERS**

Author: ADRIANA AYRES PEDROSO

Adviser: Prof. Dr. JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN

Co-adviser: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

SUMMARY

This study was conducted to evaluate the effects of growth promoter, probiotic and antibiotics on the performance and organ morphometry of broiler chickens raised in floor pens and in batteries and the ability of the additive to promote changes in the intestinal ecosystem. Additionally, the effect of probiotics on the presence of coccidia oocysts in the litter was evaluated.

The efficacy of antibiotics as growth promoters was observed when the chickens were raised in floor pens but not in batteries. Antibiotic supplementation caused changes in the structure of *Bacteria* community of the intestinal tract of chicken raised in floor pens or in batteries.

The probiotic additives tested did not result in improvement in performance in both environmental or in oocyst incidence in the litter. Also, the probiotic did not have the ability to colonize the intestinal epithelium of the birds. Discrete changes in the structure of *Bacteria* community were observed when probiotics were supplemented to chickens raised in floor pens or in batteries.

Bacteria community structure in the small intestine of chicken was modified as a function of the environmental in which the birds were raised.

Chicken fed diets devoid of growth promoters had 15 distinct phylogenetic groups in the microbiota adhered to the intestinal epithelium.

1 INTRODUÇÃO

Antibióticos em doses subterapêuticas são utilizados como promotores de crescimento para frangos há mais de 50 anos. Atualmente, em todo mundo, esta prática está enfrentando severas restrições, pois acredita-se que a administração contínua de antimicrobianos às dietas induziria o desenvolvimento da resistência bacteriana aos compostos. Probióticos, como leveduras vivas, microbiota de aves e culturas bacterianas específicas têm sido apontados como substitutos dos tradicionais aditivos, sendo preconizado que os mesmos também têm ação preventiva à coccidiose. Mas o efeito dos promotores de crescimento alternativos ainda não está estabelecido. Para a avaliação dos promotores de crescimento tradicionais e alternativos, além do estudo dos índices zootécnicos e características morfométricas de órgãos, é adequado analisar as modificações na microbiota intestinal. Métodos tradicionais de monitoramento dessas alterações parecem não ser tão efetivos como métodos moleculares. O trabalho objetivou avaliar o efeito de probióticos e antibióticos sobre características zootécnicas de frangos além de estudar a capacidade dos agentes de alterar a comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas em dois ambientes, em baterias metálicas, sem contato as excretas, e sobre piso de casca de arroz, teoricamente um ambiente que proporciona maior desafio. Adicionalmente foi estudado o efeito dos probióticos sobre a presença de oocistos na cama das aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A busca pela máxima eficiência alimentar na moderna avicultura é um ponto crítico a ser considerado nas criações comerciais. Muitos aditivos são rotineiramente utilizados em rações para controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo, promovendo melhoras nos índices zootécnicos e maximizando a produção. Segundo o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (1998) microingrediente é toda substância ou mistura de substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos para animais com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades desejáveis e suprimir as propriedades indesejáveis e que seja utilizado sob determinadas normas.

O fato é que nas últimas décadas a utilização de antibióticos em doses subterapêuticas como aditivo às rações mostrou grandes benefícios na criação animal. Os antibióticos representam um grupo de compostos com estruturas químicas heterogêneas e propriedades físico-químicas diferentes, tendo como único ponto comum a capacidade antibacteriana (Jong et al, 1985a). No trato gastrointestinal estão presentes algumas bactérias desfavoráveis ao hospedeiro que podem ser suprimidas pelos antibióticos, melhorando o desempenho e estimulando o crescimento das bactérias benéficas. Apesar de a maioria dos antibióticos apresentarem espectro de ação contra microrganismos gram-positivos, como o caso da bacitracina e virginiamicina (Magalhães et al., 1985), verifica-se inconsistência nos resultados dos experimentos que objetivam determinar o tipo de microrganismo que causa depressão no crescimento animal

e demonstrar a efetividade de determinados agentes antimicrobianos no estímulo ao desempenho animal (Zuanon et al., 1998). Não se sabe ao certo se antibióticos utilizados como promotores de crescimento possuem como um dos mecanismos de ação o efeito sobre as bactérias intestinais (Enberg et al., 2000), mas a partir dos experimentos desenvolvidos por Coates et al. (1963), em que aves *germ free* foram suplementadas com antibióticos e não obtiveram melhora no desempenho, tem sido sugerido que antimicrobianos podem levar a diminuição de certas bactérias intestinais que podem produzir toxinas ou competir por nutrientes com a ave causando depressão no desempenho.

Recentemente têm surgido críticas relacionadas à possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana, que provocaria uma menor eficiência das substâncias à terapia e a emergente exigência por parte dos importadores por produtos livres de resíduos de antibióticos (Henrique, 1998). Em julho de 1999 a União Européia decidiu banir quatro antibióticos largamente utilizados, tilosina, virginamicina, espiramicina e bacitracina de zinco (Jin et al. 2000). Neste contexto, microingredientes de origem microbiana como probióticos bacterianos específicos, leveduras vivas e microbiota liofilizada do trato gastrintestinal de aves saudáveis têm merecido especial atenção como uma alternativa ao uso dos tradicionais promotores de crescimento.

A suplementação de dietas com agentes microbianos se baseia no princípio da simbiose, em que há associação de organismos superiores com a microbiota bacteriana proporcionando aos envolvidos benefícios recíprocos. Os organismos unicelulares benéficos poderiam diminuir as chances de sobrevivência das bactérias patogênicas, melhorando a estabilidade da microbiota normal e o aproveitamento dos nutrientes ingeridos (Fatec, 1997). Os produtos têm sido comercializados com a promessa de colonizar o trato intestinal da ave protegendo-a contra patógenos (Day, 1996) e até mesmo da coccidiose. Observou-se que, por estimular a função imune das aves, uma

mistura de *Lactobacillus* oferecida a frangos teve a capacidade de diminuir a taxa de infecção por *Eimeria acervulina* em grupos recebendo suplementação dietética após desafio (Lundeen, 2001).

Alguns experimentos desenvolvidos com agentes antimicrobianos e microbianos avaliaram o peso relativo (em função do peso vivo) e por centímetro linear do trato intestinal, bons indicativos de mudanças na morfologia dos mesmos. Relatos apontam os promotores de crescimento como agentes modificadores da espessura da parede intestinal devido a eliminação de bactérias danosas (Coates et al., 1955, Eisser & Somer, 1966; Rosen, 1995). Coates et al. (1981) verificaram que aves livres de microrganismos apresentaram o intestino delgado e ceco mais leve/cm do que aves procedentes de indústria. Pesquisando a ação de antibióticos no organismo de frangos de corte, Jong et al. (1985b) observaram alterações físicas na estrutura do intestino. A manutenção de uma grande massa intestinal resultaria na maior utilização de nutrientes pela mucosa, portanto a diminuição da espessura refletiria na economia de nutrientes pela ave (Henry et al., 1987); entretanto avaliando a característica em frangos recebendo dietas com agente antimicrobiano (Loddi et al. 2000) ou com agentes microbianos (Pedroso, 1999) não foram encontrados resultados significativos.

O uso de microrganismos na alimentação animal é bastante contraditório em função de sua eficiência. O Food and Drug Administration (1988) afirmou que a produção e a comercialização de aditivos microbianos havia aumentado nos anos anteriores e não se havia demonstrado a eficiência de certos produtos.

Segundo Junqueira (1994) o valor do probiótico não foi comprovado. A base teórica que apoia o uso de microrganismos na alimentação animal é de que a população intestinal não é ideal para se alcançar um rendimento ótimo. Se esta fosse constituída por bactérias benéficas, o animal seria mais saudável,

digeriria melhor os alimentos e, por exclusão competitiva, poderia resistir à colonização de bactérias danosas (Dale, 1992).

Um dos fatores que podem interferir na possível ação do probiótico é o número e a viabilidade dos microrganismos para a formação de uma colônia e o estabelecimento de uma relação simbiótica com o animal hospedeiro (Junqueira, 1994) e, entre as normas adotadas pela "EEC Expert Commission on Animal Feeds" para a avaliação da eficácia de um probiótico, é indicada a contagem de organismos viáveis no lúmen intestinal da ave depois de cessada a administração do probiótico (Tournut, 1994).

Infelizmente muitos produtos são atualmente comercializados no mercado sem que tenha sido feita a checagem das características do microrganismo de colonizar o trato intestinal, fixar-se, reproduzir-se e eliminar bactérias maléficas conforme o preconizado pelos fabricantes. A microbiota intestinal é composta por inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (Tannock, 1998).

Estudos sobre a composição da microbiota intestinal de frangos datam de antes de 1901 e foram continuados nos anos 40, mas o estabelecimento de meios de culturas adequados para muitas bactérias intestinais só foi feito nos anos 70 (Zhu et al., 2002) E só recentemente têm surgido técnicas moleculares que permitem estudar detalhadamente a microbiota intestinal de frangos de corte.

Os métodos tradicionais para identificação de bactérias do trato intestinal incluem várias técnicas de cultura, isolamento bacteriológico, testes bioquímicos e exames morfológicos (Wang et al., 1996). Esses métodos demandam tempo e trabalho, além de que algumas técnicas só permitem o crescimento do microrganismo em meios seletivos, onde só cresceriam as bactérias que teriam

capacidade de ser cultivadas em meio artificial. Possivelmente a comunidade intestinal inclui centenas de bactérias (Tannock et al., 2000) e acima de 80% das espécies intestinais não são representadas quando se utilizam técnicas baseadas em cultivo (Langendijk et al., 1995; Suau et al., Vaughan et al., 2000). Para contornar este inconveniente têm sido sugeridas algumas técnicas moleculares simples, que não necessitem de cultivo *in vitro*, para a identificação dos microrganismos do trato intestinal (Bryant, 1997; Raskin, 1997). A metodologia da PCR tem produzido resultados rápidos e confiáveis para a detecção de microrganismos que compõem a microbiota ruminal (Reilly & Attwood, 1998), sendo um método extremamente sensível, específico e de muitas aplicações (Bej et al., 1991; Bej & Mahbubani, 1992).

Um importante avanço na área de ecologia microbiana foi o uso do rDNA 16S, uma “impressão digital” molecular que pode ser utilizada para identificar e quantificar microrganismos permitindo o desenvolvimento de técnicas independentes do cultivo para a análise da diversidade da comunidade (Amann et al., 1995). Utilizando iniciadores específicos para a região conservada rDNA 16S é possível, através de PCR, gerar produtos com tamanho de fragmentos semelhantes, mas com características de C + G diferentes. A variabilidade da sequência pode ser analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante ou DGGE (Cury, 2002). As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos determinam o comportamento de migração do gel, fazendo com que fragmentos diferentes terminem sua migração em posições diferentes (Muyzer, 1999). Desde a aplicação de DGGE, a técnica tem sido apontada como atrativa na ecologia molecular microbiana. Muitos experimentos têm feito uso da técnica como instrumento quantificador dos componentes de ecossistemas complexos (Felske et al., 1998b). Em experimentos com bactérias não cultivadas em meios artificiais, a amplificação do rDNA 16S por meio da PCR e em seguida sua quantificação em DGGE

mostrou-se eficaz (Wang et al., 1996). Analisando a microbiota intestinal de aves submetidas a probióticos, através de culturas *in vitro* e da técnica do rDNA 16S, Netherwood et al. (1999) observaram que alterações só foram passíveis de detecção a partir da metodologia molecular. Experimentos apontam que a amplificação do rDNA 16S e a análise através do DGGE é eficaz para a análise e identificação dos componentes da microbiota intestinal de suínos (Pride et al., 1999, Simpson et al., 1999, Tannock et al. 1999, Jin et al., 2000), roedores (Deplancke et al., 2000, Walter et al., 2000) e aves (Netherwood et al., 1999, Wielen et al., 2000).

A estabilidade da composição da microbiota normal do trato serve de linha mestra para o estudo dos efeitos externos sobre o sistema gastrintestinal (Madeira, 1999). Quando se administram promotores de crescimento a animais é importante que seja averiguado qual o impacto do agente na seleção ou mesmo eliminação de algumas espécies do ecossistema intestinal. Em experimento desenvolvido por McCracken et al. (2002) foi constatado que a administração de antibiótico provocou modificações na microbiota intestinal de ratos; essas mudanças foram averiguadas através de PCR seguida de DGGE.

Frangos criados em piso sobre cama podem apresentar um perfil da microbiota intestinal e desempenho diferente de aves criadas em baterias devido ao grau de desafio ao qual estão expostos. Nas condições de campo, talvez nenhum sistema de desinfecção de galpões e equipamentos garanta a criação de aves livres de microrganismos, o que impede que o animal aproveite todo o seu potencial genético. Cromwell et al. (1991) salientaram que o efeito benéfico de promotores de crescimento é maior em condições de campo, com respostas até duas vezes maiores que as observadas em estações experimentais por diferenças de higiene, estresse e presença de patógenos.

3 DESEMPENHO E MORFOMETRIA DE ÓRGÃOS DE FRANGOS SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO OU ANTIBIÓTICOS E CRIADOS EM BATERIAS OU SOBRE PISO

RESUMO

O trabalho objetivou estudar o efeito de probióticos e antibióticos, utilizados como promotores do crescimento para frangos de corte, sobre o desempenho e a morfometria de órgãos de aves criadas sobre piso e em baterias. Ainda foi estudado o efeito dos probióticos sobre a presença de oocistos na cama das aves. Para os experimentos 1 e 2 foram adotados quatro tratamentos (suplementação dietética de avilamicina, suplementação dietética de bacitracina metileno dissalicilato, suplementação dietética de enramicina e o grupo isento de antimicrobianos) com seis repetições dispostas em delineamento em blocos ao acaso. No experimento 1 foram utilizadas 288 aves, alojadas em baterias, em sala climatizada, dispostas em 12 aves por parcela; no experimento 2 foram utilizadas 1200 aves, alojadas em galpão de alvenaria, sobre piso de casca de arroz, em boxes de 50 aves cada. Os experimentos 3 e 4 foram desenvolvidos sob as mesmas condições dos experimentos 1 e 2, respectivamente, porém os tratamentos aplicados foram à base de aditivos microbianos (combinação de suplementação dietética de *Bacillus subtilis* e suplementação de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus johnsonii* na água de bebida, microbiota liofilizada de aves na água de bebida, suplementação dietética de levedura viva e o grupo isento de agentes microbianos). Frangos

suplementados com antibióticos e mantidos em baterias não responderam aos tratamentos. A suplementação com antibiótico melhorou a conversão alimentar, aumentou o peso vivo e o ganho de peso de animais que foram criados em piso. Os probióticos não afetaram o desempenho das aves criadas em piso ou em bateria. Probióticos alteraram o peso do fígado de frangos criados em baterias e em piso. Frangos suplementados com probióticos e criados em piso tiveram aumento no peso do trato intestinal. Não foi observada relação entre a frequência de oocistos na cama e o uso de probióticos.

SUMMARY

Performance and organ morphology of broilers fed probiotic or antibiotic and raised in batteries or floor pens

This study was conducted to determine the effect of probiotic and antibiotic used as growth promoters of broilers on the performance and organ morphology when the birds were raised in batteries or in floor pens. Also, the effect of probiotic on the presence of oocysts in the litter was studied. Experiments 1 and 2 consisted of four treatments (unsupplemented control diet or this diet supplemented of avilamycin, bacitracin methylene disalicylate or enramycin) and six replicates in a randomized block design. In experiment 1, 288 day-old chicks were housed in heated batteries in a environmentally controlled room, 12 chicks per cage; in experiment 2, 1200 day-old chicks were housed in a curtain-sided experimental house, with concrete floor and rice hulls as litter material, 50 chicks per pen. Experiments 3 and 4 were carried out similarly to experiments 1 and 2, respectively, but the treatments consisted of probiotics (unsupplemented control diet or *Bacillus subtilis* added to the feed plus *Lactobacillus reuteri* and *L. johnsonii* added to the water, undefined microbiot added to the water or live yeast added to the feed). The antibiotics

did not affect the performance of birds raised in batteries. Antibiotic supplementation improved feed conversion, weight gain and liveweight when the chickens were kept on the floor pens. The probiotics did not affect bird performance in both environments; however there were effects of treatments on liver weight. Probiotics caused an increase in intestinal weight of floor raised broilers. The use of probiotics was not related to the presence of oocysts in the litter.

3.1 Introdução

A utilização de antibióticos em doses subterapêuticas como aditivos às rações animais tem sido efetiva desde a década de 50. Os antibióticos representam um grupo de compostos com estruturas químicas heterogêneas e propriedades físico-químicas diferentes, tendo como ponto comum a capacidade antibacteriana (Jong et al., 1985a). Os antimicrobianos teriam a capacidade de selecionar a Microbiota intestinal suprimindo bactérias desfavoráveis e estimulando o crescimento das bactérias benéficas, melhorando o desempenho animal. Mas existem críticas relacionadas à possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos, o que provocaria uma menor eficiência terapêutica das substâncias, além da emergente exigência por parte dos importadores por produtos livres de resíduos de antibióticos (Henrique, 1998). Em julho de 1999 a União Européia decidiu banir quatro antibióticos largamente utilizados, tilosina, virginamicina, espiramicina e bacitracina de zinco (Jin et al, 2000). Neste contexto, microingredientes de origem microbiana, como probióticos bacterianos, leveduras vivas e microbiota inespecífica liofilizada do trato intestinal de aves saudáveis, têm merecido especial atenção como uma alternativa ao uso dos tradicionais promotores de crescimento.

Probióticos se baseiam no princípio da simbiose onde há associação de organismos superiores com a microbiota bacteriana proporcionando aos

envolvidos benefícios recíprocos. Os organismos unicelulares benéficos poderiam diminuir as chances de sobrevivência das bactérias patogênicas, melhorando a estabilidade da microbiota normal e o aproveitamento dos nutrientes ingeridos (Fatec, 1997). Nesse sentido os produtos têm sido comercializados com a promessa de colonizar o trato intestinal da ave protegendo-a contra patógenos (Day, 1996) e até mesmo contra coccidiose. Observou-se que por estimular a função imune das aves, uma mistura de *Lactobacillus* oferecida a frangos teve a capacidade de diminuir a taxa de infecção por *Eimeria acervulina* em grupo recebendo suplementação dietética após desafio (Lundeen, 2001).

Alguns experimentos desenvolvidos com probióticos e antibióticos avaliaram o peso relativo (em % do peso vivo) e o peso por centímetro linear do intestino delgado, os quais são bons indicativos de mudanças na morfologia do mesmo. Relatos apontam os promotores de crescimento como agentes modificadores da espessura da parede intestinal devido a eliminação de bactérias danosas (Coates et al., 1955, Eisser & Somer, 1966; Rosen, 1995), sendo que aves livres de microrganismos ("germ free") podem apresentar o trato mais leve que aves procedentes de criações comerciais (Coates et al., 1981). Pesquisando a ação de antibióticos no organismo de frangos de corte, Jong et al. (1985b) observaram alterações físicas na estrutura do intestino. A diminuição da massa intestinal pode resultar em menor utilização de nutrientes pela mucosa, refletindo na economia de nutrientes pela ave (Henry et al., 1987); entretanto, avaliando a característica em aves submetidos a dietas com antibiótico (Loddi et al., 2000) e com probiótico (Pedroso, 1999) não foram encontradas diferenças significativas.

Frangos criados em piso sobre cama podem apresentar um desempenho diferente de aves criadas em baterias devido ao grau de desafio ao qual estão expostos. Nas condições de campo, talvez nenhum sistema de desinfecção de

galpões e equipamentos garanta a criação de aves livres de microrganismos, o que impede que o animal aproveite todo o seu potencial genético. Cromwell et al. (1991) salientou que o efeito benéfico de promotores de crescimento é maior em condições de campo, com respostas até duas vezes maiores que as observadas em estações experimentais, por diferenças de higiene, estresse e presença de patógenos.

O objetivo do trabalho foi estudar o desempenho e morfometria de órgão de frangos de corte suplementados com probióticos ou antibióticos e criados em baterias metálicas ou em piso, além de observar o efeito de agentes microbianos sobre a frequência de oocistos na cama.

3.2 Material e Métodos

No Aviário Experimental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo foram conduzidos quatro experimentos. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com quatro tratamentos e seis repetições para todos os experimentos. Para os experimentos foram utilizados pintos de corte machos, da linhagem AG Ross, pesando em média 45 gramas cada.

Os tratamentos adotados nos experimentos 1 e 2, com antibióticos, foram Controle - dieta livre de aditivo promotor de crescimento, Avilamicina - dieta contendo 10 mg/kg de avilamicina, Bacitracina - dieta contendo 27,5 mg/kg de bacitracina metileno dissalicilato, e Enramicina - dieta contendo 12,5 mg/kg de enramicina. Os experimentos 3 e 4, desenvolvidos com probióticos utilizaram os seguintes tratamentos: Controle - dieta livre de aditivo promotor de crescimento, Lacto + Bs - 0,05 mg/L de produto à base de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus johnsonii* (Finelact[®]) fornecido na água no primeiro dia de idade durante quatro horas e 300 mg/kg de produto à base de *Bacillus subtilis* (Calsporin[®]) adicionado a ração durante todo o período de vida; Microbiota -

0,0625 mg/L de produto à base de microbiota liofilizada de aves (Aviguard®) adicionado à água no primeiro dia de idade durante quatro horas, e Levedura - 400 mg/kg de produto a base de levedura viva adicionado à ração durante todo o período de vida (Biosaf®).

Os experimento 1 e 3 foram conduzidos em baterias metálicas, em sala climatizada durante 21 dias. Inicialmente foram alojadas 288 aves, 12 aves por unidade experimental. Os experimentos 2 e 4 foram conduzidos em galpão de alvenaria com piso de casca de arroz durante 42 dias. Foram utilizadas inicialmente 1.200 aves, sendo cada parcela de 50 animais alojada em box de 4,5 m². Para as análises do intestino (peso e comprimento), moela (peso), coração (peso) e fígado (peso), foram sacrificadas duas aves por parcela, aos 21 dias nos experimentos 1 e 3, e aos 21 e 42 dias nos experimentos 2 e 4, após jejum de 6 horas. Semanalmente foram efetuadas pesagens das aves e da ração obtendo-se os dados de ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração, além da viabilidade.

Ao final do experimento 4, desenvolvido com probióticos fornecidos a aves criadas sobre casca de arroz, todos os boxes tiveram amostras da cama coletada. Foi traçada uma linha imaginária da porta até a parede da parcela e o material coletado de cinco pontos distintos (a 50 centímetros de distância do bebedouro, embaixo de bebedouro, entre o bebedouro e o comedouro, embaixo do comedouro, a 50 centímetros de distância do comedouro). O material foi homogeneizado e foi enviada uma alíquota de 500 gramas para contagem de oocistos em laboratório.

As dietas (Tabela 1) eram isoprotéicas, formuladas à base de milho e farelo de soja, segundo as recomendações do National Research Council - NRC (1994). Os tratamentos que consistiam de suplementação de probiótico ou antibiótico foram obtidos pela adição dos produtos à dieta. Nenhum aditivo anticoccidiano foi acrescentado às dietas.

As análises dos dados de desempenho e morfometria de órgãos foi realizada pelo procedimento General Linear Models do SAS (1998) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A análise da frequência de oocistos (presença ou ausência), foi efetuada pelo procedimento Generalized Linear Models do SAS (1998).

Tabela 1. Composição percentual e valores calculados das dietas

Ingrediente	Inicial (1-21 dias)	Crescimento (22-35 dias)	Terminação (36-42 dias)
Milho	56,771	58,544	62,419
Farelo de soja	37,651	35,127	31,114
Óleo vegetal	1,788	2,820	2,925
Fosfato bicálcico	1,944	1,668	1,690
Calcário	1,117	1,175	1,198
Mistura mineral ¹	0,050	0,050	0,050
Mistura vitamínica ²	0,100	0,100	0,080
DL – metionina, 99%	0,179	0,146	0,143
Cloreto de colina, 60%	0,050	0,040	0,030
Sal	0,350	0,350	0,350
Valores calculados			
Energia metabolizável, kcal/kg	3000,00	3050,00	3100,00
Proteína bruta (%)	22,00	21,00	19,50
Cálcio (%)	1,00	0,95	0,95
Fósforo disponível (%)	0,45	0,40	0,40
Metionina (%)	0,51	0,47	0,45
Metionina + cistina (%)	0,88	0,82	0,77
Lisina (%)	1,21	1,14	1,03

1 - Mistura Mineral, por quilograma do produto: Fe 40.000 mg; Cu 12.000 mg; Mn 65.000 mg; Zn 50.000 mg; I 1.000 mg.

2 - Mistura Vitamínica, por quilograma do produto: vit. A 1.000.000 UI; vit. D₃ 2.000.000 UI; vit. E 12.500 mg; vit. K₃ 2.500 mg; vit. B₁ 2.400 mg; vit. B₂ 6.000 mg; vit. B₃ 3.200 mg, vit. B₁₂ 12.000 mcg; ácido pantotênico 12.500 mg; niacina 30.000 mg, antioxidante 15 g, Se 200 mg.

3.2 Resultados e Discussão

Não houve efeito dos antibióticos sobre as características de desempenho analisadas no experimento desenvolvido em baterias (Tabela 2). Quando os mesmos tratamentos foram aplicados no galpão convencional observaram-se efeitos significativos dos antibióticos no ganho de peso e conversão alimentar nos períodos de 1 a 21 e 1 a 42 dias (Tabela 3). As aves que receberam

Tabela 2. Desempenho de frangos de 1 a 21 dias de idade criados em baterias e suplementados com antibiótico (Experimento 1).

	Controle	Bacitracina	Enramicina	Avilamicina	CV (%)	
Ganho de peso, g	825	774	779	780	6,28	ns
Consumo de ração, g	1081	1042	1055	1044	3,28	ns
Conversão alimentar	1,311	1,355	1,356	1,344	6,15	ns
Viabilidade, %	100	97	97	97	4,18	ns

ns - não significativo ($p > 0,05$)

Tabela 3. Desempenho de frangos de 1 a 21 e 1 a 42 dias de idade criados sobre piso e suplementados com antibióticos (Experimento 2).

	Controle	Bacitracina	Enramicina	Avilamicina	CV (%)	
1 a 21 dias de idade						
Ganho de peso, g	848 ab	839 ab	876 a	834 b	2,85	Pr<0,05
Consumo de ração, g	1146	1128	1148	1113	2,29	ns
Conversão alimentar	1,345 a	1,350 a	1,311 b	1,334 ab	1,53	Pr<0,03
Viabilidade, %	98	98	98	98	1,71	ns
1 a 42 dias de idade						
Ganho de peso, g	2539 b	2558 ab	2617 a	2614 a	1,63	Pr<0,02
Consumo de ração, g	4438	4494	4469	4456	1,46	ns
Conversão alimentar	1,748 a	1,756 a	1,707 b	1,704 b	1,40	Pr<0,01
Viabilidade, %	97	97	97	97	1,78	ns

a, b - letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente

ns - não significativo ($p > 0,05$)

enramicina tiveram melhores resultados de ganho de peso do que as aves que receberam avilamicina no período de 1 a 21 dias e apresentaram ainda melhor conversão alimentar em comparação a bacitracina e o grupo controle. De 1 a 42 dias os grupos que receberam enramicina e avilamicina tiveram melhor ganho de peso do que as aves do grupo controle. A conversão alimentar foi melhor nos grupos que receberam enramicina e avilamicina do que no grupo que recebeu bacitracina e o grupo controle. Foi observado que frangos suplementados com antibióticos e mantidos em baterias não responderam aos tratamentos, enquanto os antibióticos melhoraram o desempenho de frangos criados em piso. Talvez a microbiota intestinal das aves mantidas em piso tenha influenciado os resultados obtidos com o uso dos produtos, uma vez que as aves criadas em baterias não apresentaram qualquer alteração no desempenho. Em levantamento de dados da literatura sobre o efeito de antibióticos sobre frangos aos 42 dias, Butolo (1999) constatou que o ganho de peso e a eficiência alimentar melhoraram, respectivamente, 3,5 e 3,4% em relação ao grupo controle; no presente experimento houve melhora no ganho de peso de 3,0 % no grupo recebendo enramicina e 2,9 % no grupo que recebeu avilamicina, e a melhora na conversão alimentar foi de 2,4 e 2,5 %, respectivamente, valores bem próximos aos citados pelo autor. Em relação aos dados de morfometria de órgãos, não houve diferenças significativas para qualquer condição de criação, quer seja em baterias metálicas (Tabela 4) ou em galpão de alvenaria sobre piso de casca de arroz (Tabela 5).

Observa-se que nos experimentos desenvolvidos com probióticos em bateria metálica (Tabela 6) e em galpão sobre piso (Tabela 7) não houve qualquer benefício ou prejuízo sobre as características de desempenho analisadas. Os grupos que receberam dietas isentas de aditivos microbianos tiveram índices zootécnicos similares aos dos grupos tratados; possivelmente o ambiente no qual os animais foram criados, em bateria ou sobre piso, não foi

Tabela 4. Morfometria de órgãos de frangos aos 21 dias de idade criados em baterias e suplementados com antibiótico (Experimento 1).

	Controle	Bacitracina	Enramicina	Avilamicina	CV (%)	
Peso do intestino, g/cm	0,218	0,212	0,206	0,207	10,01	ns
Peso relativo do intestino, g / 100 g de PV	3,164	3,172	3,245	3,141	11,38	ns
Comprimento do intestino, cm	120,66	123,25	126,58	125,50	5,44	ns
Peso da moela, g	20,28	19,39	20,33	20,14	7,47	ns
Peso do coração, g	5,58	5,50	5,26	5,32	7,91	ns
Peso do fígado, g	16,79	16,66	16,44	16,65	4,88	ns

ns - não significativo ($p>0,05$)

Tabela 5. Morfometria de órgãos de frangos aos 21 e 42 dias de idade criados em piso e suplementados com antibiótico (Experimento 2).

	Controle	Bacitracina	Enramicina	Avilamicina	CV (%)	
21 dias						
Peso do intestino, g/cm	0,221	0,230	0,215	0,225	5,71	ns
Peso relativo do intestino, g / 100 g de PV	3,633	3,633	3,342	3,604	8,57	ns
Comprimento do intestino, cm	143,08	135,00	140,50	135,50	5,17	ns
Peso da moela, g	21,84	20,74	21,30	19,57	5,93	ns
Peso do coração, g	5,52	4,94	5,69	5,11	9,34	ns
Peso do fígado, g	19,48	19,81	19,75	18,65	7,69	ns
42 dias						
Peso do intestino, g/cm	0,411	0,390	0,418	0,402	12,51	ns
Peso relativo do intestino, g / 100 g de PV	3,001	2,895	2,991	2,952	14,52	ns
Comprimento do intestino, cm	188,75	183,91	196,91	191,25	6,78	ns
Peso da moela, g	42,12	40,91	42,13	41,57	7,38	ns
Peso do coração, g	11,87	12,54	12,84	12,92	10,66	ns
Peso do fígado, g	45,73	47,85	48,02	48,76	12,50	ns

ns - não significativo ($p>0,05$)

Tabela 6. Desempenho de frangos de 1 a 21 dias de idade criados em baterias e suplementados com probióticos (Experimento 3).

	Controle	Lacto + Bs	Microbiota	Levedura	CV (%)	
Ganho de peso, g	620	635	591	667	12,60	ns
Consumo de ração, g	864	917	838	941	11,78	ns
Conversão alimentar	1,461	1,408	1,406	1,393	4,55	ns
Viabilidade, %	90	96	96	97	9,16	ns

ns - não significativo ($p > 0,05$)

Tabela 7. Desempenho de frangos de 1 a 21 e 1 a 42 dias de idade criados sobre piso e suplementados com probiótico (Experimento 4).

	Controle	Lacto + Bs	Microbiota	Levedura	CV (%)	
1 a 21 dias de idade						
Ganho de peso, g	758	762	774	766	3,26	ns
Consumo de ração, g	1074	1068	1077	1081	2,18	ns
Conversão alimentar	1,440	1,418	1,425	1,425	1,69	ns
Viabilidade, %	93	97	94	96	3,28	ns
1 a 42 dias de idade						
Ganho de peso, g	2462	2459	2486	2462	2,13	ns
Consumo de ração, g	4339	4349	4386	4359	1,86	ns
Conversão alimentar	1,806	1,800	1,800	1,800	0,73	ns
Viabilidade, %	92	96	94	92	3,43	ns

ns - não significativo ($p > 0,05$)

capaz de prejudicar o desempenho das aves que não receberam suplementos. Em experimento desenvolvido com aditivos microbianos, Maiorka et al. (2001) observaram que frangos do grupo controle tiveram desempenho inferior ao observado nas aves que receberam os agentes. Fato interessante reside sob as características de morfometria de órgão, em que foram observadas alterações no peso do fígado de aves cujas dietas continham levedura. Quando os animais foram mantidos em baterias (Tabela 8) notou-se diferença entre o grupo consumindo dieta contendo o agente e os demais tratamentos aos 21 dias.

Resultado discrepante foi obtido nas aves criadas em galpão aos 42 dias (Tabela 9), em que houve redução no fígado dos animais alimentados com levedura em comparação ao grupo isento de produtos microbianos. Os tratamentos *Lactobacillus* + *B. subtilis* e Microbiota mostraram-se capazes de promover um aumento no peso do trato intestinal (gramas/cm) de aves criadas em piso de casca de arroz, se compararmos com o grupo controle.

Tabela 8. Morfometria de órgãos de frangos aos 21 dias de idade criados em baterias e suplementados com probióticos (Experimento 3).

	Controle	Lacto + Bs	Microbiota	Levedura	CV (%)	
Peso do intestino, g/cm	0,231	0,235	0,210	0,240	10,53	ns
Peso relativo do intestino, g / 100 g de PV	4,435	4,271	4,863	4,210	13,83	ns
Comprimento intestino, cm	128,83	130,50	128,00	131,58	5,62	ns
Peso da moela, g	19,78	20,33	19,75	20,49	7,80	ns
Peso do coração, g	4,45	5,40	4,76	5,34	17,57	ns
Peso do fígado, g	15,98 b	16,45 b	15,92 b	19,20 a	9,90	Pr<0,02

a, b - letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente

ns - não significativo ($p>0,05$)

Em todos os experimentos foi observado um ligeiro aumento no coeficiente de variação nos dados zootécnicos dos experimentos desenvolvidos em baterias se compararmos com os obtidos quando as aves foram criadas sobre casca de arroz. Esses valores foram atribuídos a capacidade máxima de suporte de cada unidade experimental, 12 aves em cada gaiola da bateria *versus* 50 aves em cada box do galpão de alvenaria. Os valores do coeficiente de variação observados para as características de morfometria órgãos em todos os experimentos são devidos ao número de aves amostradas.

Tabela 9. Morfometria de órgãos de frangos aos 21 e 42 dias de idade criados sobre e suplementados com probióticos (Experimento 4).

	Controle	Lacto + Bs	Microbiota	Levedura	CV (%)	
21 dias						
Peso do intestino, g/cm	0,230 c	0,275 a	0,256 ab	0,250 bc	6,05	Pr<0,02
Peso relativo do intestino, g / 100 g de PV	4,311	4,791	4,340	4,401	2,95	ns
Comprimento intestino, cm	141,66	137,75	137,83	141,16	7,69	ns
Peso da moela, g	22,00	23,10	23,38	21,34	10,77	ns
Peso do coração, g	5,55	5,64	5,83	5,59	10,00	ns
Peso do fígado, g	20,70	20,88	21,46	20,21	9,04	ns
42 dias						
Peso do intestino, g/cm	0,410	0,420	0,393	0,425	8,24	ns
Peso relativo do intestino, g / 100 g de PV	2,865	2,826	2,728	2,836	7,51	ns
Comprimento intestino, cm	172,50	171,00	174,58	165,00	5,86	ns
Peso da moela, g	41,45	39,44	40,67	37,53	8,45	ns
Peso do coração, g	13,38	13,30	13,40	13,18	10,58	ns
Peso do fígado, g	49,54 a	45,53 ab	45,77 ab	43,59 b	6,84	Pr<0,04

a, b, c - letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente

ns - não significativo ($p>0,05$)

Não foi observada associação entre a presença ou ausência de oocistos na cama das aves e a suplementação com aditivos microbianos (Tabela 10); não houve efeito dos tratamentos sobre a frequência de oocistos ao nível de 54,67 %. Mesmo sem a utilização de aditivos anticoccidianos, não foram observados sinais do patógeno na cama de casca de arroz ou nas aves; e quando foi observada a presença do parasita em análise laboratorial, a contagem de oocistos foi baixa, da ordem de 133 a 800 oocistos/grama de cama. Possivelmente as instalações experimentais ofereceram um baixo desafio às aves; talvez durante uma situação de desafio controlado, como a inoculação

via oral de oocistos de *Eimeria*, os produtos tivessem exercido algum efeito no controle do protozoário.

Tabela 10. Frequência absoluta e relativa de oocistos presentes ou ausentes na cama de frangos suplementadas com probióticos (Experimento 4)

	Controle	Lacto + Bs	Microbiota	Levedura	Total de observações
Presentes	3 (50,00 %)	1 (16,67 %)	1 (16,67 %)	2 (33,33 %)	7 (29,17 %)
Ausentes	3 (50,00 %)	5 (83,33 %)	5 (83,33 %)	4 (66,67 %)	17 (70,83 %)
Total de observações	6 (25,00 %)	6 (25,00 %)	6 (25,00 %)	6 (25,00 %)	24 (100,00 %)

3.3 Conclusões

Antibióticos podem ser utilizados satisfatoriamente como promotores de crescimento para aves criadas sobre piso.

Não há evidência de efeito favorável dos probióticos sobre o desempenho e incidência de oocisto na cama das aves.

4 ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM RAÇÕES DE FRANGOS ALTERAM A COMUNIDADE BACTERIANA INTESTINAL

RESUMO

As técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), clonagem e seqüenciamento foram usadas para caracterizar mudanças na microbiota intestinal de frangos de corte resultantes do consumo de dietas suplementadas com antibióticos. Aves criadas em bateria ou sobre piso tiveram o raspado do trato intestinal coletado. O DNA total das amostras foi extraído e a região V1-V3 do rDNA 16S foi amplificada por PCR, os amplicons resultantes analisados através de DGGE. O número de espécies encontradas na microbiota intestinal, avaliado pelo número de amplicons detectados por DGGE, não foi afetado pelos antibióticos nas duas condições de criação ($P > 0,05$). A análise de agrupamento hierárquico gerado pelas amostras oriundas de animais criados em bateria mostrou que a comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos isentos de suplementação com antibióticos (CON) difere das comunidades intestinais de frangos suplementados com ENR, AVI ou BAC. As estruturas das comunidades de *Bacteria* dos tratamentos com AVI e BAC foram mais semelhantes entre si do que em relação ao tratamento com ENR. A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino do animal recém nascido do lote de aves criadas em bateria apresentou maior semelhança com o grupo CON do que com as estruturas dos

animais dos demais tratamentos. A análise do agrupamento hierárquico gerado pelas amostras provenientes de aves criadas sobre piso, mostrou que a comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos suplementados com AVI e ENR foram distintas das demais. As estruturas da comunidade de *Bacteria* dos animais dos grupos BAC e CON foram semelhantes. A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino do animal recém nascido do lote de aves criadas sobre piso divergiu da estrutura da comunidade intestinal observada em todos os tratamentos. Não houve diferenças no Cs intratratamentos ($P > 0,05$). Nos dois experimentos desenvolvidos, as seis aves que integraram cada tratamento não apresentaram variações significativas entre as comunidades de *Bacteria* de seus intestinos, avaliadas através do Cs ($P > 0,05$). Os antibióticos modificaram diferentemente a microbiota intestinal de frangos de corte criados em condições distintas. A análise do agrupamento hierárquico da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas sobre piso demonstrou que as estruturas das comunidades intestinais são bastante semelhantes entre si. A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos que receberam BAC e AVI e foram criadas em baterias foram mais semelhantes as comunidades intestinais das aves criadas sobre piso. Uma biblioteca da região V1-V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do intestino de aves isentas de suplementação com antibióticos e criados sobre piso foi construída e 768 clones foram seqüenciado. As 516 seqüências válidas analisadas representaram 15 grupos filogenéticos distintos. Aproximadamente 69,5% das seqüências representassem o grupo Lactobacillus e 18,6% o grupo Pseudomonas. Do total de seqüências, 6,0% não apresentaram homologia com seqüências de bancos de domínio público. Seqüências dos grupos Eubactérias, Entéricas, Bacteróides, Acidorovax, Clostridium, Rhizobium-Agrobacterium, Cloroplasto-Cyanella e Sphingomonas representaram aproximadamente 5,9% das seqüências analisadas. Os resultados demonstram que técnicas independentes do cultivo, como a PCR

seguida de DGGE podem ser úteis para o monitoramento de alterações na estrutura da comunidade microbiana intestinal induzidas pela suplementação de antibióticos, e que a clonagem e seqüenciamento de amplicons de rDNA 16S podem ser usadas para caracterização dessa comunidade.

SUMMARY

Antibiotics growth promoters in broiler feed alter the intestinal bacterial community

The techniques of polymerase chain reaction followed by denaturing gradient gel electrophoresis, cloning and sequencing were used to characterize the changes in intestinal microbiota of broilers as a result of feeding diets supplemented of antibiotic growth promoters. Chicks raised in batteries or in floor pens had the small intestine mucosa scraped. The total DNA extracted, and the V1-V3 region of 16S rDNA amplified by PCR and directly cloned. The number of species found in the intestinal microbiota, measured by the number of amplicons, was not changed by the antibiotics in both rearing conditions ($P>0.05$). In the cluster produced from intestinal bacteria community of chicken raised in batteries, there were distinct branches for the ENR and unsupplemented (CON) treatments, and AVI and BAC were similar. The intestinal bacteria community of newly hatched chick from the batteries experiment was more similar to CON. The cluster from intestinal bacteria community the chickens raised in floor pens showed distinct branches for AVI and ENR, and BAC and CON were similar. The intestinal bacteria community of newly hatched chick from the floor pen experiment constituted a different branch. The intratreatment Cs were not different ($P>0.05$) in both experiments; the six replicate birds from each treatment did not show differences. The antibiotics differently alter the intestinal microbiota of chickens raised in distinct

environments. The bacterial structure from chickens raised in floor pens were clearly grouped in the same branch, and intestinal bacteria community of chicken of BAC or AVI raised in battery were more similar to this group than the other samples. 516 clones analyzed represented 15 phylogenetic groups of Bacteria, but 69.5% of sequences represented the group *Lactobacillus* e 18.6% the group *Pseudomonas*. 6.0% of total sequences were classified as without homology with known sequences. Sequences of groups Eubacterias, Entericas, Bacteroides, Acidovorax, Clostridium, Rhizobium Agrobacterium, Chloroplasto Cyanella e Sphingomonas represented 5.9% of the sequences studied. Results demonstrate that techniques independent of culture, such as PCR followed by DGGE, cloning and sequencing may be useful in monitoring the changes in intestinal microbiota resulting from feeding antibiotics.

4.1 Introdução

Os antibióticos representam um grupo de compostos com estruturas químicas heterogêneas e propriedades físico-químicas diferentes, tendo como único ponto comum a capacidade antimicrobiana (Jong et al, 1985). Apesar de a maioria dos antibióticos apresentarem espectro de ação contra microrganismos gram-positivos (Magalhães et al., 1985), verifica-se inconsistência nos resultados dos experimentos que objetivam determinar quais grupos de microrganismos causam depressão no crescimento, e qual agente antimicrobiano é efetivo para o desempenho animal (Zuanon et al., 1998). Não se sabe ao certo se antibióticos utilizados como promotores de crescimento têm como mecanismo de ação o efeito sobre as bactérias intestinais (Enberg et al., 2000). No entanto, a partir de experimento desenvolvido por Coates et al. (1963), onde aves livres de microrganismos (*germ free*) foram suplementadas com antibióticos e não apresentaram melhora no desempenho em comparação a aves *germ free* não suplementadas, têm sido sugerido que antimicrobianos

podem levar a diminuição ou eliminação de bactérias intestinais que prejudicam o desempenho.

A microbiota intestinal é composta por inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico (Tannock, 1998). Os estudos sobre a composição da microbiota intestinal de frangos de corte datam de antes de 1901 e foram continuados nos anos 40. Porém o estabelecimento de meios de cultura adequados para muitas bactérias intestinais só foi obtido nos anos 70 (Zhu et al., 2002).

A modificação da população bacteriana intestinal do hospedeiro em resposta a fatores externos, como tipo de dieta ou antibiótico é difícil de ser monitorada através de métodos tradicionais (McCracken et al., 2001). Acredita-se que acima de 80% das espécies bacterianas intestinais não são representadas quando se utilizam técnicas baseadas em cultivo (Langendijk et al., 1995; Suau et al., 1999; Vaughan et al., 2000), as quais são seletivas e laboriosas (Wang et al., 1996). Possivelmente, a comunidade microbiana intestinal inclui centenas de bactérias (Tannock et al., 2000), e técnicas moleculares simples, que não necessitem de cultivo *in vitro* para a identificação dos microrganismos do trato intestinal podem ser adotadas (Bryant, 1997; Raskin, 1997). Recentemente, várias técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para a identificação e quantificação de microrganismos (Netherwood, et al. 1999; Pryde, et al., 1999). A reação em cadeia da polimerase (PCR), um método extremamente sensível, específico e de muitas aplicações (Bej et al., 1991; Bej et al., 1992), tem produzido resultados rápidos e confiáveis para a detecção de microrganismos que compõem a microbiota ruminal (Reilly et al., 1998).

Um importante avanço na área de ecologia microbiana foi o uso do rDNA 16S, uma “impressão digital” molecular, para identificar e classificar microrganismos, permitindo o desenvolvimento de técnicas independentes de

cultivo para a análise da diversidade microbiana (Amann et al., 1995). Pace (1986) foi o pioneiro nas análises de estrutura de comunidades microbianas utilizando as informações das seqüências de nucleotídeos do rDNA 16S. Além da existência de regiões extremamente conservadas entre grupos filogeneticamente relacionados, entremeada por regiões de alta variabilidade, a grande quantidade de rDNA na maioria das células, a aparente ausência de transferência genética lateral e um tamanho satisfatório, com cerca de 1500 nucleotídeos, torna esse gene ideal para inferências filogenéticas (Amann & Ludwig, 2000). Utilizando-se iniciadores para regiões conservadas do rDNA 16S, é possível, através de PCR, gerar amplicons com tamanhos semelhantes, mas com conteúdo C + G diferentes.

A variabilidade nas seqüências do rDNA 16S pode ser analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) (Cury, 2002). As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes amplicons determinam o comportamento de migração no gel, o qual varia em função do conteúdo de G + C (Muyzer, 1999). Desde a aplicação da DGGE por Muyzer et al. (1993), a técnica tem sido apontada como atrativa na ecologia molecular microbiana. Muitos experimentos têm utilizado a DGGE como instrumento quantificador dos componentes de comunidades microbianas complexas (Felske et al., 1998). Em experimentos com bactérias não cultivadas em meios artificiais, a amplificação do rDNA 16S por meio da PCR e em seguida sua quantificação por DGGE mostrou-se eficaz (Wang et al., 1996). Comparando a microbiota intestinal de aves submetidas a probióticos através de culturas *in vitro* e análise do rDNA 16S, Netherwood et al. (1999) observaram que alterações na estrutura da comunidade bacteriana só foram passíveis de detecção utilizando-se metodologia molecular. A amplificação do rDNA 16S e análise de amplicons por DGGE tem sido utilizada para a caracterização da microbiota intestinal de suínos (Pride et al., 1999, Simpson et al., 1999,

Tannock et al. 1999, Jin et al., 2000), roedores (Deplancke et al., 2000; Walter et al., 2000; McCracken et al., 2001) e frangos (Wang et al., 1996; Netherwood et al., 1999; Wielen et al., 2000; Zhu et al., 2002).

A identificação das espécies bacterianas presentes em um determinado ecossistema podem ser feitas com base na seqüência de bases do rDNA 16S, bem como por análise filogenéticas (Torsvik & Ovreas, 2002). Resumidamente, a técnica consiste na extração do DNA dos microrganismos diretamente da amostra ambiental e amplificação de regiões específicas do rDNA 16S. Esses amplicons são então clonados e seqüenciados. Em seguida, análises filogenéticas podem ser realizadas, comparando-se a seqüência obtida com seqüências depositadas em bancos de dados públicos. Essa técnica possibilita uma avaliação do efeito real dos antibióticos utilizados como promotores de crescimento sobre a composição da microbiota intestinal de frangos.

A composição da microbiota normal do trato intestinal serve de linha mestra para o estudo dos efeitos externos sobre o sistema gastrintestinal (Madeira, 1999). Quando se administram promotores de crescimento a animais é importante que seja averiguado qual o impacto do agente na seleção de microrganismos específicos no ecossistema intestinal ou mesmo eliminação de algumas espécies do ecossistema intestinal. Avaliando a microbiota normal do ceco de frangos, Zhu et al. (2002) determinaram que a região contém uma vasta microbiota indesejável, responsável por várias enterites em aves. Naquele estudo foram seqüenciados aproximadamente 1600 clones de rDNA 16S de *Bacteria*, representando 50 grupos ou subgrupos filogenéticos. Outras pesquisas recentes constataram que o uso de antibióticos, com finalidade promotora de crescimento pode selecionar a microbiota do íleo de frangos (Knarreborg et al., 2002; Lee et al., 2002).

O ambiente no qual o animal é criado pode também modificar a microbiota intestinal (Tannock, 1998). Frangos criados em piso sobre cama

podem apresentar comunidades microbianas com estruturas diferentes das de aves criadas em baterias, devido às condições de acesso ao material da cama e ingestão de partículas de excretas, afetando o desempenho dos animais.

O objetivo deste trabalho foi determinar se a suplementação com agentes antimicrobianos e criação em ambientes distintos, sobre piso e em baterias metálicas, alteram a estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos de corte, utilizando-se DGGE de amplicons da região V1-V3 de bactérias e seqüenciamento de uma biblioteca de rDNA 16S.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Procedimento de campo

Foram conduzidos dois experimentos com frangos de corte utilizando três produtos antimicrobianos: avilamicina (10 mg/kg de dieta), bacitracina metileno dissalicilato (27,5 mg/kg de dieta), enramicina (12,5 mg/kg de dieta) e um grupo isento de promotores de crescimento. Pintos de um dia foram adquiridos de incubatório comercial. O experimento 1 foi conduzido em baterias metálicas, em sala climatizada. Inicialmente foram alojadas 288 aves, 12 aves por unidade experimental. O experimento 2 foi conduzido em galpão de alvenaria sobre piso de casca de arroz. Foram utilizadas 1.200 aves no total, sendo cada parcela de 50 animais alojada em box de 4,5 m². O delineamento adotado em ambos os experimentos foi em blocos casualizados com seis repetições por tratamento. Ao final dos experimentos, aos 21 dias de idade dos animais, após jejum de seis horas, uma ave por parcela foi sacrificada por deslocamento cervical, o trato gastrintestinal exposto, e o intestino delgado foi coletado. Com o auxílio de uma lâmina cirúrgica estéril descartável, a mucosa do duodeno, jejuno e íleo foi exposta, o material coletado por raspagem, envasado em microtubos estéreis e mantido a -80°C até o momento do processamento.

4.2.2 Extração do DNA total

O raspado da mucosa do intestino delgado das aves foi homogeneizado e uma alíquota de 100 mg retirada. O DNA total da amostra foi extraído utilizando-se o kit FastDNA Spin (Bio 101, Vista, Califórnia), de acordo com as instruções do fabricante. A microtubos de 1,5 mL foi adicionado 1 mL de solução CLS-TC (solução de lise celular para tecidos animais e bactérias), 100 mg de amostra e um cilindro plástico de ¼ de polegada. Os tubos foram agitados, horizontalmente, por 10 s a 4 m s^{-1} , em um homogeneizador FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Bio 101, Vista, Califórnia). Em seguida, centrifugou-se por 5 min a 13000 *g*; 600 μL do sobrenadante foi transferido para um microtubo limpo e adicionado 600 μL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 1 min por inversão. Os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente, e centrifugados por 30 s em velocidade mínima. O sobrenadante foi descartado. O pélete foi resolubilizado em 500 μL de solução de lavagem (SEWS) e a solução incubada por 1 min à temperatura ambiente. A solução foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo, o conjunto foi centrifugado duas vezes por 1 min a 13000 *g*. Os filtros foram transferidos para microtubos limpos, onde foi adicionado 100 μL de solução DES a matriz de ligação. Incubou-se por 5 min a temperatura ambiente, e centrifugou-se por 5 min a 13000 *g*. Os filtros foram descartados e a solução de DNA coletada. A integridade do DNA total foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,0% - 0,5X TBE (1X TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8) e densitometria, utilizando-se um densitrômetro laser FluorImage (Amershan Biosciences) e o programa Fragment Analyses (Amershan Biosciences). A quantificação do DNA foi feita usando como padrão o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O DNA foi armazenado a -20°C .

4.2.3 PCR

Para a amplificação de fragmentos específicos da região V3 do rDNA 16S de microrganismos de domínio *Bacteria* utilizou-se o seguinte conjunto de iniciadores: BA338fCG (5´ CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GCA CGG GGG GAC TCC T AC GGG 3´) e UN518r (5´ ATT ACC GCG GCT GCT GG 3´) (Ovreas et al., 1997). Em solução contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador, 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 5 µL do tampão da reação 10X e 25 ng de DNA. O DNA foi adicionado após desnaturação inicial a 95 °C. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 5 min a 95°C; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, pareamento à 55°C por 1 min e extensão a 72°C durante 1 min; extensão final à 72°C durante 10 min. Uma alíquota dos produtos de PCR (amplicons) foi analisada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% - 0,5X TBE e densitometria conforme descrito acima.

4.2.4 DGGE

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante. Os géis de 8% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1; m:m) foram preparados com gradiente desnaturante variando de 15 a 55%, usando duas soluções: solução 100% de desnaturação contendo 40% (vol/vol) formamida e 7 M uréia, e solução 0% de desnaturação sem uréia ou formamida (Ovreas et al., 1997). A DGGE foi realizada utilizando-se o equipamento DCode (BioRad) em géis de 16 x 16 x 0,1 cm e tampão TAE 0,5X (1X TAE: 40 mM Tris acetato e 1 mM EDTA). Quantidades iguais (500 ng) do produto de PCR foram utilizadas. A eletroforese foi realizada a 200V e 60°C durante 4 h. Os géis foram fixados com ácido

acético 10% por 20 min, lavados com água desionizada três vezes, imersos em metanol 50% por 20 min, novamente lavados com água desionizada e corados com SYBR Green I (0,1 µL/mL) por 30 min. Após a coloração, os géis foram analisados utilizando-se um densitômetro laser FluorImage (Amershan Biosciences) e o programa Fragment Analyses (Amershan Biosciences).

4.2.5 Construção da biblioteca de amplicons do rDNA 16S

Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit S.N.A.P. Purification System (Invitrogen) antes da ligação em vetores de clonagem. A clonagem foi feita em One Shot *E. coli* INV F, usando o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após plaqueamento em meio Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina e X-Gal, colônias de transformantes foram transferidas para 5 mL de meio de cultivo LB e cultivadas por aproximadamente 16 h. O plasmídeo foi extraído por lise alcalina, digerido com *Eco* RI e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0% - 0,5X TBE, para determinar o tamanho do inserto.

4.2.6 Seqüenciamento de amplicons do rDNA 16S

A amplificação dos insertos por PCR foi feita com a enzima AmpliTaq polimerase e "BigDye terminator" (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando-se o iniciador M13r (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'). O seqüenciamento foi feito em seqüenciador capilar Applied Biosystems (model 3100), conforme recomendações do fabricante.

4.2.7 Análise de dados

Os perfis de amplicons, após separação por DGGE, foram comparados usando o coeficiente de similaridade de concordância simples (simple matching), definido por:

$$Cs = (a + d) (a + b + c + d)^{-1}$$

Onde:

Cs = índice de similaridade entre a amostra i e j,

a = número de amplicons comuns às amostras i e j,

b = número de amplicons presentes na amostra i,

c = número de amplicons presentes na amostra j,

d = número de amplicons diferentes nas amostras i e j.

A análise de variância do número de amplicons foi realizada utilizando-se o procedimento General Linear Models do SAS (1998), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Também foi efetuada a análise do Cs dentro de tratamentos, para averiguar se existem diferenças entre as seis repetições seguindo o mesmo procedimento.

Dados binário determinados pela presença ou ausência dos amplicons detectados nas diferentes amostras, foram utilizados para a análise de agrupamento hierárquico, através do programa SYSTAT 8.0 (1996), utilizando o algoritmo de Ward para ligação e distância em porcentagem como unidade de medida.

4.2.8 Processamento das seqüências

As seqüências obtidas foram processadas para remoção de vetor contaminante e bases de baixa qualidade (índice de qualidade < 20) utilizando-se os programas Phred/Phrap. As seqüências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTO) utilizando-se o programa CAP3. A seqüência consenso de cada UTO foi comparada com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (RDP Project) para identificação da espécie bacteriana. A análise filogenética foi realizada através do programa PHYLIP (www.rdp.msu.edu/html). A análise de rarefação foi feita utilizando-se o

programa RAREFACTION CALCULATOR (www.biology.valberte.ca). A análise de frequência de UTOs foi feita através do pacote estatístico SYSTAT 8.0 (1996).

4.3 Resultados e Discussão

Em levantamento bibliográfico foi observado que muitos trabalhos com aves, que fizeram uso de técnicas moleculares, tiveram como foco do estudo o ceco de frangos de corte (Wielen et al., 2000; Apajalahti et al., 2001; Zhu et al., 2002) e de galinhas poedeiras adultas (Lan et al. 2002). Outra pesquisa avaliou a mistura do conteúdo do papo, duodeno e ceco (Nethewood et al., 1999). Apesar da região ser apontada com problemática na exploração de frangos de corte, pois pode abrigar grande parte das bactérias potencialmente prejudiciais à saúde humana, o intestino delgado também deve ser foco de pesquisas. Pesquisas que avaliaram parcialmente o intestino delgado de frangos, o íleo, foram desenvolvidas por Knarreborg et al. (2002) e Lee et al. (2002). Devido a pouca quantidade de informações geradas, optou-se por estudar neste trabalho as três porções do intestino delgado, duodeno, jejuno e íleo. Amostras foram coletadas e homogeneizadas sem que fosse feita distinção entre as regiões, de forma a representar o intestino delgado.

A microbiota aderida ao epitélio difere da dispersa no lúmen intestinal e a separação desses materiais pode não ser tão eficiente quando efetuada em laboratório (Zhu et al. 2002); por esta razão optou-se por manter as aves que integraram o experimento em jejum nas horas que antecederam seu abate, para que de fato pudesse ser coletada somente a microbiota aderida ao tecido. Acredita-se que a microbiota do trato pode conferir proteção física contra a penetração de patógenos (Stern et al., 1994; Zhu et al., 2002) os quais podem reduzir o desempenho em aves, por estar relacionada diretamente a fatores digestivos e metabólicos (Krause et al., 1999).

4.3.1 DGGE

É preconizado que a microbiota intestinal é vasta com aproximadamente 400 espécies conhecidas (Moore et al., 1974), sendo que muitas raramente são detectadas (Moore et al., 1995). As espécies bacterianas identificadas através de técnicas baseadas no cultivo normalmente são as mais abundantes na microbiota intestinal (Draser et al., 1985). No presente, um total de 104 diferentes amplicons da região V3 do rDNA 16S foram detectados (Figura 1), quando as amostras foram coletadas de animais suplementados com antibióticos e mantidos em baterias. Quando o experimento foi desenvolvido sobre piso, o número de amplicons detectados foi de 79 (Figura 2).

Considerando-se a abundante diversidade apontada na literatura, o DGGE pode ter conduzido a subestimação no número de indivíduos encontrados. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de algumas bactérias apresentam baixa abundância na população intestinal, e conseqüentemente seu DNA pode não ter sido amplificado ou os amplicons resultantes não puderam ser detectados pela metodologia usada. Outro motivo pelo qual o número de amplicons pode não representar o total de espécies bacterianas presentes no intestino seria a comigração de fragmentos do rDNA 16S de diferentes espécies na DGGE.

É possível que algumas bandas sejam fragmentos do rDNA 16S de diferentes bactérias com o mesmo conteúdo de C+G (Simpson et al., 1999). Portanto uma banda detectada na DGGE pode corresponder a mais de um amplicon e conseqüentemente, mais de um genótipo bacteriano. A existência de mais de um genótipo por banda observada no DGGE foi constatada após seqüenciamento do DNA de várias bandas excisadas nos géis (dados não apresentados).

Mesmo com a limitação observada, a DGGE foi útil para avaliar diferenças na estrutura da comunidade no intestino de frangos suplementados com diferentes antibióticos. Se as amostras apresentarem padrões de migração

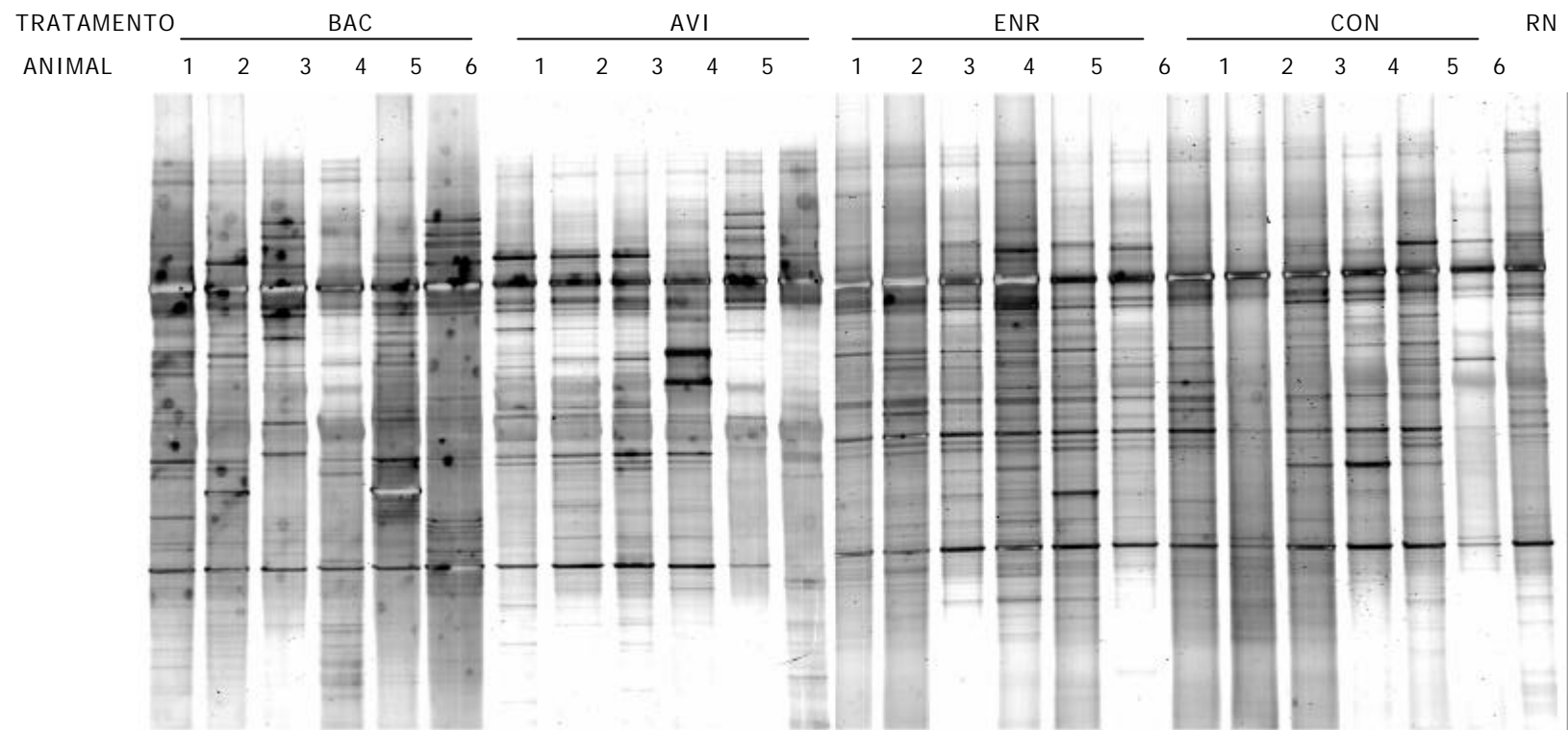


Figura 1 - DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI) ou enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON) e um animal recém nascido (RN) também foi utilizado (Experimento 1).

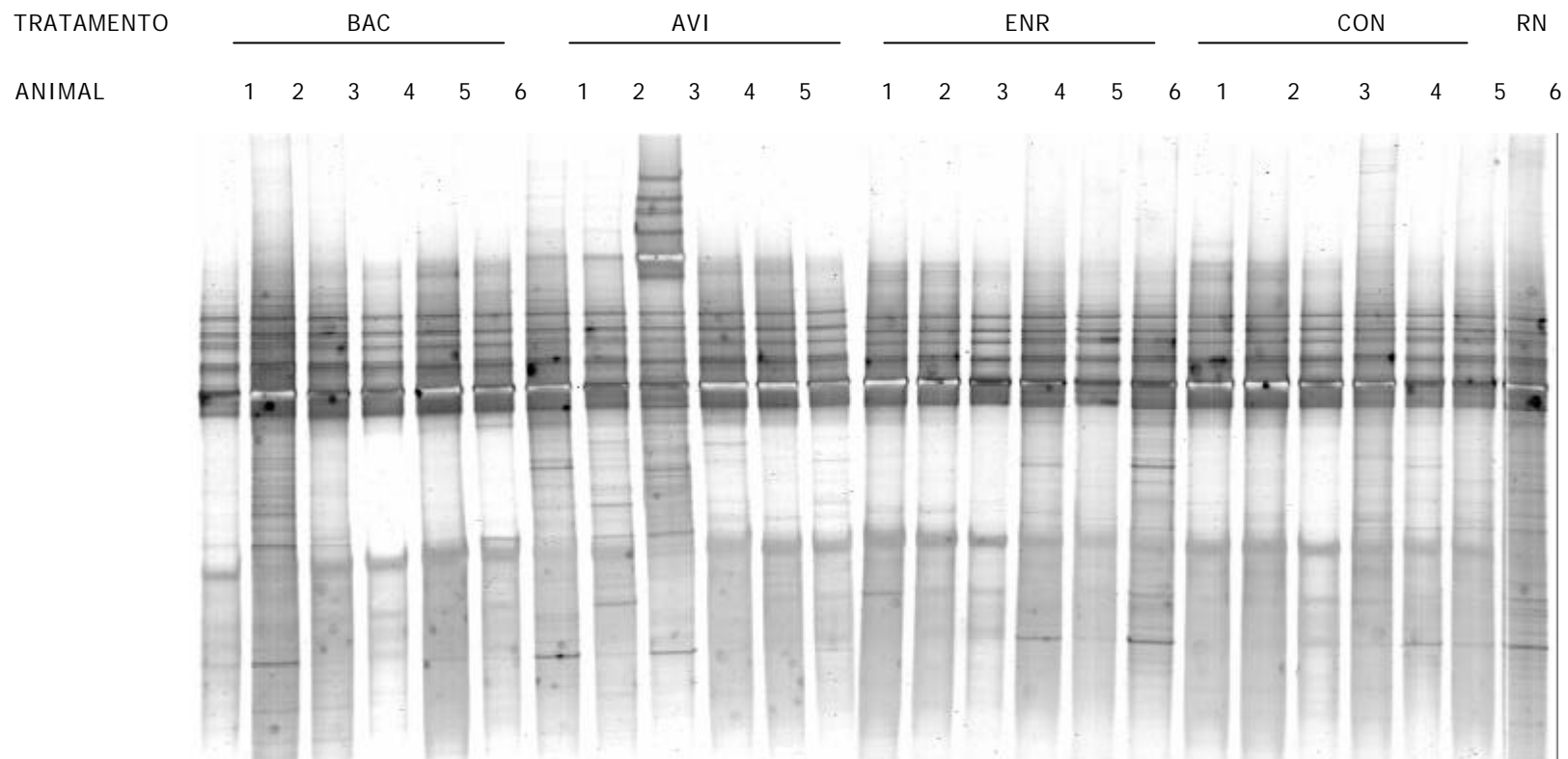


Figura 2 - DGGE de amplicons da região V3 do rDNA de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados sobre piso e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI) ou enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON) e um animal recém nascido (RN) também foi utilizado (Experimento 2).

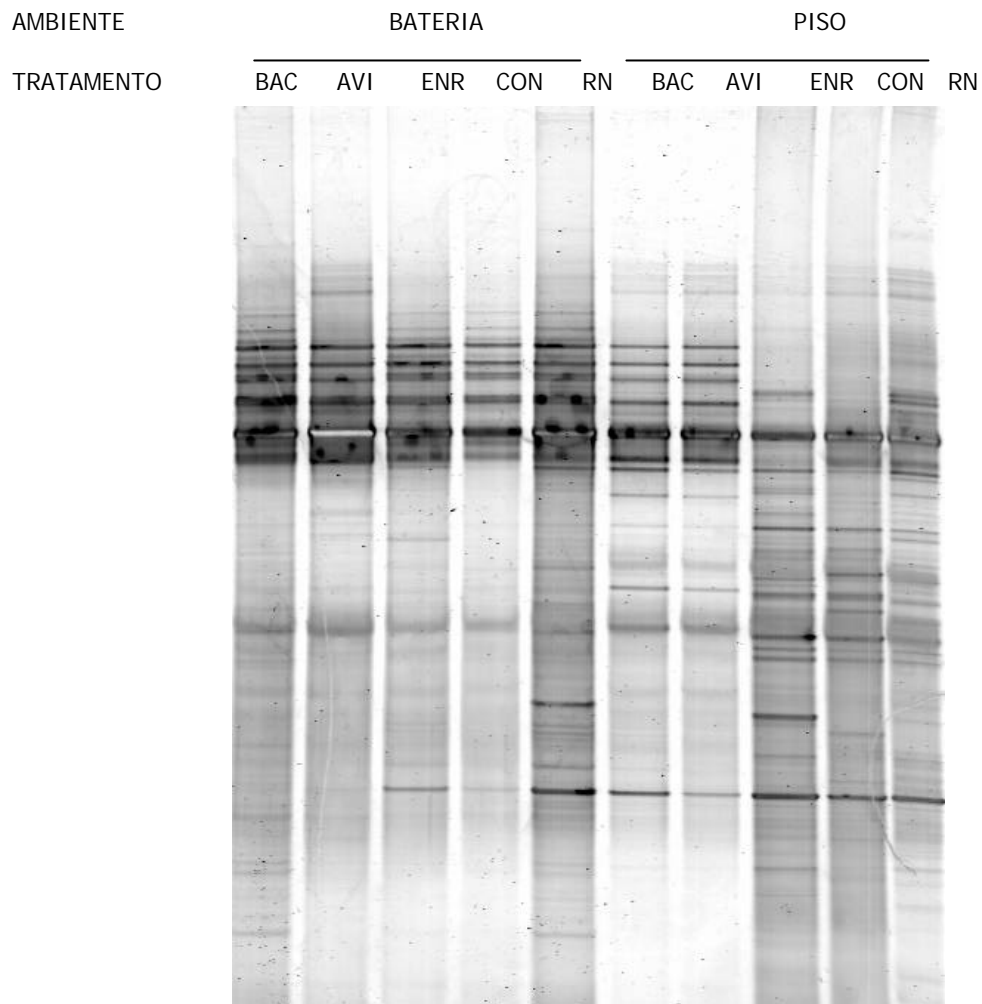


Figura 3 - DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI) ou enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON) e os animais recém nascidos (RN) utilizados (Experimento 1 e 2).

diferentes, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças, no entanto se o padrão de migração de bandas de duas amostras for igual pode não significar que as comunidades tenham a mesma estrutura, havendo necessidade do emprego de outras técnicas para detectá-las (Cury, 2000).

Tabela 1. Número médio de amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI), enramicina (ENR) ou isentos de promotores de crescimento (CON).

TRATAMENTO	BATERIA	PISO
BAC	41,00 a	23,17 a
AVI	39,00 a	26,33 a
ENR	47,30 a	23,16 a
CON	41,16 a	23,33 a
CV (%)	13,43 a	14,32 a

a – médias seguidas de letras iguais nas mesmas condições de criação não diferem estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$)

Nos experimentos desenvolvidos em bateria e sobre piso de casca de arroz, os números médios de amplicons detectados em amostras colhidas do raspado do trato intestinal de frangos são apresentados na Tabela 1.

Os antibióticos administrados tiveram a capacidade de modificar a microbiota intestinal das aves, mas não tiveram a capacidade de diminuir o número de espécies bacterianas presentes no trato intestinal, em relação ao grupo COM, isento de antibióticos. Os animais recém nascidos são os que apresentaram um padrão de amplicons mais divergente dos demais, com um número total de amplicons, 58 no experimento desenvolvido em bateria e, 45 no experimento desenvolvido sobre piso de casca de arroz.

Os dados sugerem que a diversidade microbiana observada em RN diminui com o desenvolvimento da ave. Acredita-se que a ave logo após o

nascimento apresenta baixa diversidade microbiana no intestino (Maiorka et al., 2001). No presente estudo a diversidade microbiana trato intestinal de RN, avaliada por DGGE foi comparável a de frangos com 21 dias e criados em baterias. Essas bactérias podem ser oriundas da matriz no momento de postura do ovo, da incubadora, do nascedouro ou do processamento e transporte dos pintos até o local de criação.

No experimento desenvolvido com aves suplementadas com antibióticos e criadas em bateria observa-se um alto coeficiente de similaridade (Cs) entre as estruturas das comunidades de *Bacteria* do trato intestinal de animais submetidos a um mesmo tratamento (Tabela 2). O mesmo é observado quando se analisa o ecossistema intestinal de frangos de corte suplementados com antimicrobianos e criados sobre piso (Tabela 3). Zhu et al., (2002) observaram que pode haver diferenças na microbiota de aves criadas sob condições similares. Neste experimento, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre o coeficiente de similaridade das estruturas da comunidade de *Bacteria* de indivíduos dentro de um mesmo tratamento tanto em bateria ou sobre piso (Tabela 4). Outros estudos que analisaram a microbiota intestinal de ratos, suínos e humanos mostraram que a similaridade entre a estrutura da comunidade de *Bacteria* entre indivíduos sob o mesmo tratamento é baixa (McCartney et al., 1996, Kimura et al., 1997, Zoetendal, 1998, Simpson et al., 2000, McCracken et al., 2001).

No presente ensaio, as aves que constituíram cada um dos experimentos tiveram a mesma origem, vieram do mesmo incubatório e são provenientes de matrizes criadas sob as mesmas condições sanitárias, dietéticas e ambientais, o que poderia explicar a alta similaridade entre a estrutura da comunidade entre os indivíduos sob um mesmo tratamento.

A análise de agrupamento hierárquico possibilita identificar grupos de tratamentos com estrutura similares da comunidade de bactérias. Em

Tabela 2. Coeficientes de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI) ou enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON) e o animal recém nascido (RN).

		BAC						AVI						ENR						CON					
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
BAC	(2)	0,827																							
	(3)	0,808	0,846																						
	(4)	0,885	0,769	0,808																					
	(5)	0,827	0,865	0,846	0,885																				
	(6)	0,808	0,827	0,865	0,846	0,904																			
	AVI	(1)	0,827	0,788	0,846	0,846	0,846	0,846																	
(2)		0,779	0,779	0,837	0,779	0,817	0,856	0,837																	
(3)		0,846	0,769	0,846	0,846	0,808	0,865	0,808	0,894																
(4)		0,817	0,740	0,798	0,837	0,798	0,798	0,798	0,846	0,894															
(5)		0,837	0,760	0,875	0,817	0,798	0,817	0,856	0,808	0,817	0,827														
(6)		0,846	0,731	0,827	0,846	0,808	0,827	0,808	0,798	0,904	0,856	0,837													
ENR	(1)	0,750	0,673	0,750	0,769	0,731	0,731	0,750	0,740	0,788	0,817	0,760	0,769												
	(2)	0,712	0,654	0,750	0,731	0,692	0,712	0,712	0,721	0,769	0,779	0,740	0,731	0,904											
	(3)	0,769	0,712	0,808	0,750	0,731	0,769	0,788	0,760	0,827	0,798	0,817	0,788	0,885	0,885										
	(4)	0,663	0,625	0,721	0,683	0,663	0,663	0,721	0,673	0,721	0,731	0,712	0,702	0,856	0,913	0,875									
	(5)	0,663	0,663	0,760	0,721	0,702	0,702	0,721	0,750	0,760	0,769	0,731	0,721	0,856	0,875	0,837	0,885								
	(6)	0,740	0,702	0,798	0,779	0,721	0,740	0,779	0,750	0,798	0,808	0,808	0,760	0,856	0,779	0,856	0,769	0,827							
CON	(1)	0,721	0,663	0,740	0,760	0,721	0,702	0,702	0,692	0,721	0,731	0,750	0,702	0,721	0,683	0,721	0,673	0,712	0,827						
	(2)	0,731	0,654	0,712	0,750	0,692	0,731	0,712	0,683	0,731	0,721	0,760	0,712	0,692	0,654	0,712	0,625	0,663	0,760	0,875					
	(3)	0,779	0,702	0,798	0,817	0,760	0,760	0,760	0,750	0,779	0,788	0,808	0,760	0,760	0,721	0,779	0,731	0,750	0,827	0,923	0,856				
	(4)	0,779	0,721	0,779	0,798	0,760	0,740	0,779	0,788	0,779	0,827	0,808	0,740	0,779	0,740	0,779	0,712	0,712	0,827	0,846	0,798	0,885			
	(5)	0,740	0,683	0,760	0,760	0,740	0,721	0,740	0,712	0,721	0,731	0,769	0,702	0,721	0,683	0,740	0,673	0,673	0,788	0,885	0,798	0,923	0,865		
	(6)	0,788	0,692	0,761	0,769	0,712	0,750	0,769	0,760	0,788	0,779	0,798	0,75	0,73	0,654	0,731	0,644	0,663	0,798	0,779	0,769	0,837	0,856	0,817	
RN	0,625	0,548	0,625	0,644	0,625	0,606	0,625	0,577	0,58	0,596	0,654	0,58	0,56	0,529	0,606	0,558	0,577	0,673	0,712	0,644	0,750	0,712	0,712	0,644	

Os dados são referentes ao Experimento 1.

Os números entre parênteses são referentes aos indivíduos avaliados.

Tabela 3. Coeficientes de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em piso e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI) ou enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON) e o animal recém nascido (RN).

		BAC						AVI						ENR						CON					
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
BAC	(2)	0,909																							
	(3)	0,909	0,922																						
	(4)	0,909	0,922	0,948																					
	(5)	0,896	0,909	0,883	0,935																				
	(6)	0,922	0,883	0,883	0,909	0,948																			
	(6)	0,818	0,831	0,753	0,779	0,818	0,818																		
AVI	(2)	0,857	0,896	0,818	0,818	0,805	0,831	0,909																	
	(3)	0,792	0,831	0,753	0,753	0,766	0,766	0,948	0,909																
	(4)	0,844	0,883	0,831	0,831	0,844	0,844	0,870	0,935	0,870															
	(5)	0,883	0,896	0,844	0,844	0,857	0,883	0,883	0,922	0,857	0,935														
	(6)	0,870	0,909	0,883	0,857	0,844	0,870	0,844	0,935	0,844	0,948	0,961													
	(6)	0,870	0,831	0,805	0,831	0,844	0,870	0,818	0,857	0,792	0,896	0,883	0,870												
ENR	(2)	0,870	0,831	0,805	0,831	0,844	0,870	0,818	0,857	0,792	0,896	0,883	0,870	0,974											
	(3)	0,844	0,831	0,805	0,831	0,844	0,870	0,844	0,857	0,792	0,870	0,883	0,870	0,922	0,948										
	(4)	0,844	0,857	0,831	0,831	0,870	0,870	0,844	0,857	0,818	0,896	0,883	0,870	0,948	0,922	0,922									
	(5)	0,883	0,870	0,844	0,870	0,909	0,909	0,857	0,870	0,831	0,909	0,896	0,883	0,935	0,935	0,909	0,961								
	(6)	0,831	0,844	0,818	0,818	0,831	0,857	0,805	0,844	0,779	0,857	0,870	0,857	0,935	0,935	0,961	0,961	0,922							
	(6)	0,844	0,831	0,805	0,805	0,818	0,844	0,792	0,831	0,766	0,844	0,857	0,844	0,870	0,870	0,844	0,844	0,857	0,831						
CON	(2)	0,883	0,844	0,818	0,844	0,857	0,883	0,779	0,818	0,753	0,857	0,870	0,857	0,909	0,909	0,857	0,857	0,896	0,844	0,961					
	(3)	0,883	0,844	0,818	0,870	0,883	0,909	0,805	0,818	0,753	0,831	0,870	0,857	0,883	0,883	0,883	0,857	0,896	0,844	0,935	0,948				
	(4)	0,805	0,818	0,766	0,792	0,805	0,831	0,779	0,818	0,753	0,805	0,844	0,831	0,805	0,805	0,779	0,805	0,844	0,792	0,831	0,844	0,870			
	(5)	0,883	0,896	0,844	0,870	0,883	0,909	0,831	0,870	0,805	0,883	0,922	0,909	0,909	0,909	0,883	0,909	0,948	0,896	0,883	0,922	0,896	0,870		
	(6)	0,870	0,883	0,831	0,883	0,922	0,922	0,844	0,831	0,792	0,870	0,883	0,870	0,870	0,870	0,870	0,896	0,935	0,857	0,870	0,909	0,935	0,857		
	(6)	0,494	0,455	0,429	0,455	0,494	0,519	0,494	0,481	0,442	0,494	0,506	0,494	0,519	0,494	0,494	0,519	0,532	0,481	0,442	0,481	0,506	0,481	0,532	0,545

Os dados são referentes ao Experimento 2.

Os números entre parênteses se referem aos indivíduos avaliados.

experimentos desenvolvidos com ratos, McCracken et al. (2001) relataram que houve modificação na estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal quando o antimicrobiano cefotoxina foi fornecido. Na criação em baterias, a estrutura das comunidades de *Bacteria* do trato intestinal de frangos que receberam o mesmo antibiótico são mais similares entre si do que em relação a dos demais tratamentos (Figura 4). Nessas mesmas condições observa-se também que as estruturas da comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos suplementados com AVI ou BAC são mais similares entre si, do que em relação aos grupos ENR ou CON. Observa-se que a estrutura da comunidade bacteriana intestinal de frangos não suplementados com antibióticos é mais similar a do RN do que os demais tratamentos.

Tabela 4. Coeficiente de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI), enramicina (ENR) ou isentos de promotores de crescimento (CON).

Repetição	BATERIA				PISO			
	BAC	AVI	ENR	CON	BAC	AVI	ENR	CON
1	0,831 a	0,821 a	0,871 a	0,861 a	0,909 a	0,890 a	0,942 a	0,896 a
2	0,826 a	0,836 a	0,871 a	0,819 a	0,909 a	0,922 a	0,942 a	0,916 a
3	0,834 a	0,863 a	0,867 a	0,884 a	0,909 a	0,885 a	0,932 a	0,916 a
4	0,838 a	0,844 a	0,859 a	0,850 a	0,924 a	0,911 a	0,942 a	0,854 a
5	0,865 a	0,829 a	0,856 a	0,857 a	0,914 a	0,911 a	0,932 a	0,901 a
6	0,850 a	0,840 a	0,817 a	0,811 a	0,909 a	0,906 a	0,942 a	0,901 a
CV (%)	4,27	4,23	4,54	5,13	2,39	4,52	4,11	2,08

a – médias seguidas de letras iguais nas mesmas condições de criação não diferem estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$)

Na análise do agrupamento hierárquico das estruturas das comunidades de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas sobre piso (Figura 5) observa-se que as estruturas das comunidades bacteriana do trato intestinal de aves

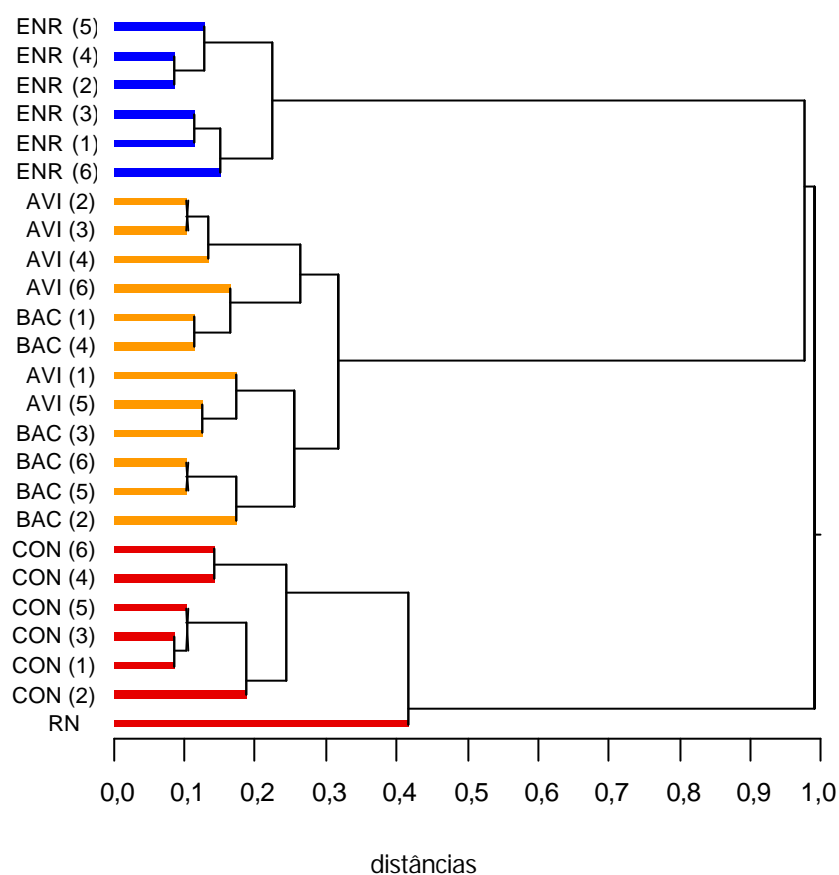


Figura 4 - Análise do agrupamento hierárquico gerado com base no perfil dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI), enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON), e o animal recém nascido (RN). Os dados referem-se ao Experimento 1. Os números entre parênteses referem-se aos indivíduos analisados.

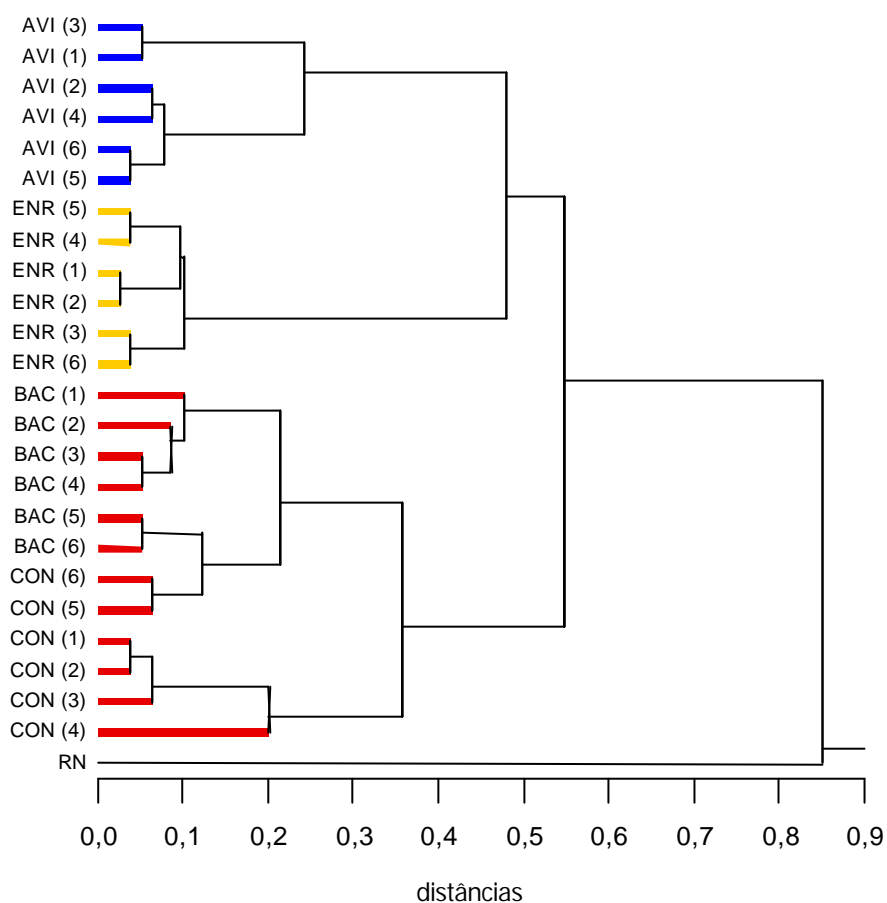


Figura 5 - Análise do agrupamento hierárquico gerado com base no perfil dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados sobre piso e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI), enramicina (ENR), isentos de promotores de crescimento (CON), e o animal recém nascido (RN). Os dados referem-se ao Experimento 2. Os números entre parênteses referem-se aos indivíduos analisados.

suplementadas com ENR e AVI foram distintas das demais. Houve maior similaridade nas estruturas da comunidade bacteriana do trato intestinal de aves suplementadas com BAC e o CON. A estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal do animal foi completamente diferente dos demais.

Tabela 5. Coeficiente de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria (BATERIA) ou sobre piso (PISO) e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI), enramicina (ENR), isento de promotores de crescimento (CON) e o animal recém nascido (RN).

		BAT					PISO			
		BAC	AVI	ENR	CON	RN	BAC	AVI	ENR	CON
BATERIA	AVI	0,856								
	ENR	0,837	0,827							
	CON	0,865	0,875	0,894						
	RN	0,817	0,731	0,827	0,760					
PISO	BAC	0,769	0,798	0,779	0,846	0,721				
	AVI	0,750	0,817	0,779	0,865	0,683	0,942			
	ENR	0,548	0,577	0,558	0,606	0,500	0,663	0,644		
	CON	0,606	0,654	0,615	0,683	0,558	0,760	0,740	0,788	
	RN	0,519	0,567	0,529	0,596	0,510	0,673	0,654	0,606	0,721

Para elucidar as diferenças entre as comunidades de bactérias do intestino de aves criadas em bateria e sobre piso uma amostra representando cada um dos tratamentos, nos dois ambientes, foi analisada através de DGGE. Os coeficientes de similaridade entre as estruturas das comunidades de bactérias obtidos nas análises das amostras representativas de cada tratamento nas duas condições experimentais podem ser observado na Tabela 5. Os antibióticos tiveram a capacidade de modificar o ecossistema intestinal de

frangos de corte, mas atuaram de maneira diferente em condições divergentes de criação. Em aves criadas em bateria, o coeficiente de similaridade entre as comunidades de *Bacteria* do trato intestinal nos tratamentos com antibióticos foi 0,865 - 0,854, em relação ao CON, isentos de antibióticos. Já em aves criadas sobre piso o coeficiente de similaridade entre as estruturas das comunidades da bactéria do trato intestinal nos tratamentos com antibióticos foi de 0,606 - 0,683, em relação ao CON, isentos de antibióticos. A análise do agrupamento hierárquico (Figura 6) revelou claramente o agrupamento das estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos em função do modo de criação das aves. As estruturas da comunidade de bactérias do trato intestinal de frangos mantidos sobre piso ou em baterias foram distintas. A estrutura da comunidade bacteriana intestinal de aves recebendo BAC ou AVI e criadas em baterias foram mais semelhantes à esse agrupamento do que às demais. No planejamento desse ensaio, foram escolhidos dois ambientes distintos de criação: em baterias, com uma densidade baixa de animais, onde a ave não tem acesso às excretas e teoricamente o desafio ao qual o animal é submetido é menor; e sobre piso, em uma densidade mais elevada, onde a ave tem acesso ao material da cama e o desafio, teoricamente, é maior. Adicionalmente, os dois experimentos foram conduzidos em épocas diferentes do ano e com animais oriundos de incubatórios diferentes; isto poderia explicar a variação nos dados obtidos, principalmente em relação às aves recém nascidas nas quais a microbiota intestinal é exclusivamente proveniente da matriz e/ou do incubatório, já que nenhum tratamento foi administrado. O desenvolvimento de experimentos simultâneos que façam uso de aves provenientes da mesma granja é essencial para esclarecer qual dos fatores é predominante nas alterações das comunidades de bactérias observadas com o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em dietas de frangos de corte

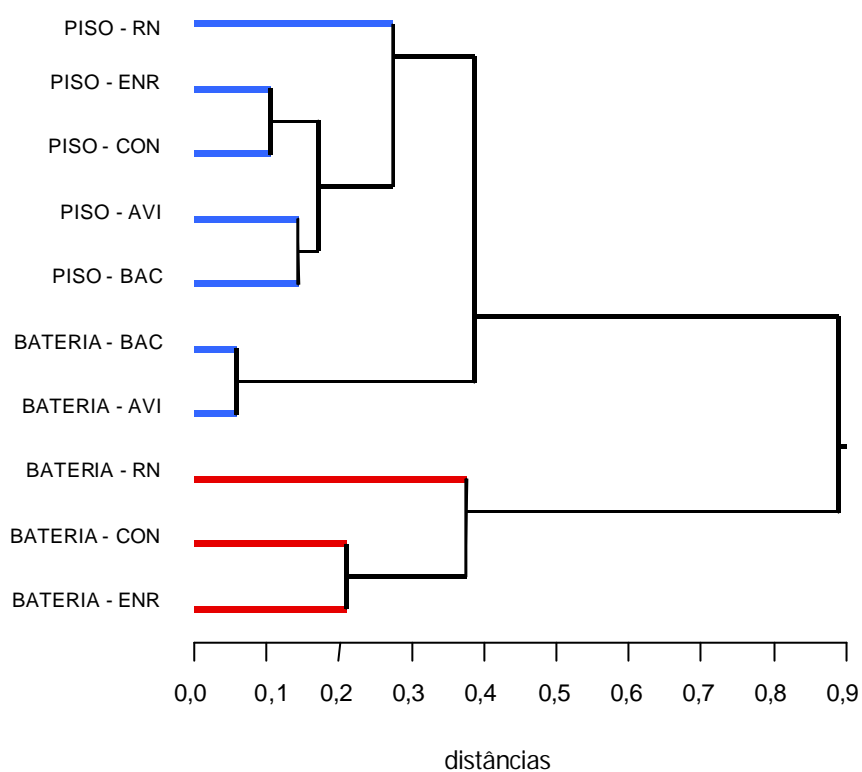


Figura 6 - Análise do agrupamento hierárquico gerado com base no perfil dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com bacitracina metileno dissalicilato (BAC), avilamicina (AVI), enramicina (ENR), isento de promotores de crescimento (CON), e o animal recém nascido (RN). Os dados referem-se aos Experimentos 1 e 2.

4.3.2 Biblioteca da região V1-V3 de rDNA 16S

Em trabalho efetuado na década de 70 utilizando técnicas de cultivo *in vitro* foi estimado que a diversidade da microbiota total do trato intestinal de frangos pode ser superior a 400 espécies (Moore et al., 1974). Para estimar a diversidade da microbiota intestinal normal de frangos neste estudo uma biblioteca da região V1-V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do intestino de aves do grupo CON foi construída e seqüenciada. Um total de 768 seqüências foram obtidas e 516 seqüências válidas foram analisadas para determinar sua identidade respectiva. As seqüências foram agrupadas em 15 unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com base em sua similaridade, utilizando-se o programa CAP3 (Tabela 6 e Figura 7) e comparadas com as depositadas no Ribosomal Database Project (RDP) no período de dezembro de 2002 a abril de 2003. Aproximadamente 94% das seqüências obtidas apresentaram homologia com as depositadas no banco de dados e 6% das seqüências não apresentaram homologia com nenhuma seqüência depositada no banco de dados, podendo representar novas espécies.

Apenas três UTOs representaram 87,8% das seqüências obtidas. A UTO 4, agrupou seqüências pertencentes o grupo *Lactobacillus* da subdivisão *Bacillus - Lactobacillus - Streptococcus*, e apresentou 69,2% das seqüências estudadas. As UTOs 10 e 11 agruparam seqüências pertencentes ao grupo *Pseudomonas* da subdivisão Gama das Proteobacterias, e representaram respectivamente, 12,2% e 6,4% do total de seqüências válidas.

Aproximadamente 6,2% do total de seqüências obtidas no estudo pertenceram as 11 UTOs restantes. Foram encontradas seqüências correspondentes aos grupos *Clostridium* (UTO 1) e Eubactérias (UTOs 2 e 3) da subdivisão *Bacillus - Lactobacillus - Streptococcus*; grupo *Lactobacillus* da subdivisão *Bacillus - Lactobacillus - Streptococcus* (UTO 3); grupos *Rhizobium - Agrobacterium* (UTO 6) e *Sphingomonas* (UTO 7) da subdivisão Alpha das

Proteobacterias, grupo Acidovorax (UTO 8) da subdivisão Beta das Proteobacterias, grupo Entéricas (UTO 9) da subdivisão Gama das Proteobacterias, grupo Bacteróides (UTO 12) da subdivisão Bacteróide - Cytophaga, e o grupo Cloroplasto Cyanella (UTO 13).

As 2 UTOs restantes, UTO 14, contendo 0,38% das seqüências válidas e UTO 15, contendo 5,6% das seqüências, não apresentaram homologia com nenhuma seqüência depositada no RDP.

As 13 UTOs que apresentaram homologia com as depositadas no RDP foram utilizadas para determinação de suas relações filogenéticas (Figura 8).

Duas UTOs que apresentaram homologia com o grupo *Lactobacillus*, representados por *Lactobacillus aviarius aviarius* e *Weissella confusos* corroboram os resultados obtidos por Lee et al. (2002), que observaram que espécies de *Lactobacillus* representou 68,8% da população ileal avaliada através de bibliotecas de rDNA 16S. A bactéria acidificadora do trato está relacionada com a saúde intestinal (Fuller, 1989). Os *Lactobacillus* têm como característica fundamental o efeito inibidor que exercem sobre outras bactérias, devido principalmente à produção de ácido láctico em concentrações elevadas (Medeiros, 1998). Muitas espécies são largamente utilizadas como probióticos para animais, no entanto, nenhum dos produtos probióticos disponíveis no mercado brasileiro utilizam *L. aviarius aviarius* ou qualquer espécie de *Weissella*. Várias formulações utilizam *L.salivarium salicinius*, *L. trechodes* e *L. buchneri* (Santos et al., 2002), *Lactobacillus* sp. (Kanashiro et al., 2001), *L. acidophilus* e *L. plantarum* (Cavalcante et al., 1996) e *L. acidophilus* (Silva et al., 2000). Talvez a formulação de probióticos contendo as espécies de *Lactobacillus aviarius aviarius* possam beneficiar as aves devido a sua capacidade de capacidade permanência no trato intestinal. Bier (1985) já demonstrou que algumas espécies de *Lactobacillus* têm a capacidade de se aderir no trato intestinal e devem ser utilizadas com esta finalidade.

Tabela 6. Número de seqüências obtidas, similaridade com seqüências depositadas no RDP de cada unidade taxonômica operacional (UTO) do trato intestinal de frangos recebendo dietas isentas de promotores de crescimento.

Divisão	Subdivisão	Grupo	Subgrupo	Vizinho próximo	S	N	UTO	
Gram Positiva		Clostridium	<i>Clostridium cadavericus</i>	organismo não nomeado	94	2	1	
		Eubactérias	<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>R. torques</i>	89	2	2	
			<i>Clostridium lituseburense</i>	<i>C. lituseburense</i> ATCC 25759	90	5	3	
		Bacillus Lactobacillus Streptococcus	Lactobacillus	<i>Lactobacillus mali</i>	<i>L. aviarius aviarius</i> ATCC 43234	87	357	4
		<i>Weissella viridescens</i>		<i>W. confusus</i> ATCC 10881	86	2	5	
Proteobacteria	Alpha	Rhizobium Agrobacterium	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> LMG 9980	98	6	6	
		Sphingomonas	<i>Sphingomonas subartica</i>	<i>S. aromaticivorans</i> IFO 16084	91	3	7	
	Beta	Acidovorax	<i>Acidovorax avenae</i>	<i>Acidovorax</i> LW1 str LW1	97	2	8	
	Gama	Entéricas	<i>Enterobacteria</i>	clone VADIN BB56	95	4	9	
		Pseudomonas	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P. putida</i> K23-1	99	63	10	
			<i>Pseudomonas azotoformans</i>	<i>P. gessardi</i> CIP 105469	99	33	11	
Flexibacter Cytophaga Bacteroide	Bacteróide Cytophaga	Bacteróide	<i>Bacteroides fragilis</i>	Bacteroide AR20	52	4	12	
Cyanobacteria e Cloroplasto		Cloroplasto e Cyanella	Charophyta Embryophita Chloroplasto	Cloroplasto de Glycine max	90	2	13	
Seqüência sem homologia com o RDP					-	2	14	
Seqüência sem homologia com o RDP					-	29	15	

Cs – Coeficiente de similaridade na biblioteca seqüenciada (%).

N – Número de seqüências obtidas na biblioteca seqüenciada.

UTO – Unidade taxonômica operacional.

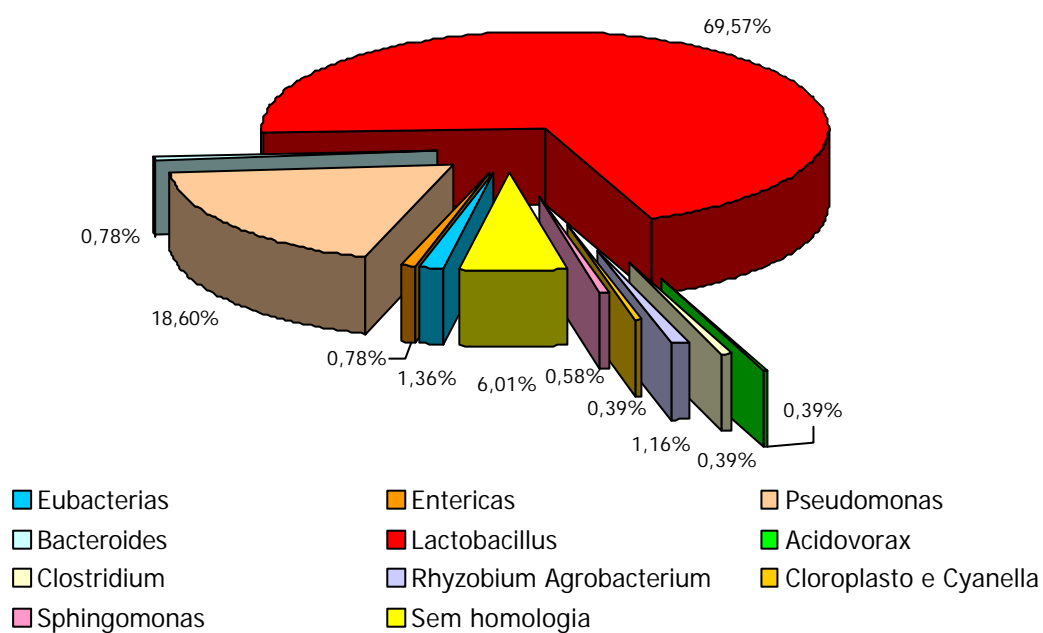


Figura 7 - Classificação de seqüências da região V1-V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos alimentados com dietas isentas de promotores de crescimento. As seqüências foram comparadas com seqüências do RDP através do programa Sequence Match (RDP)

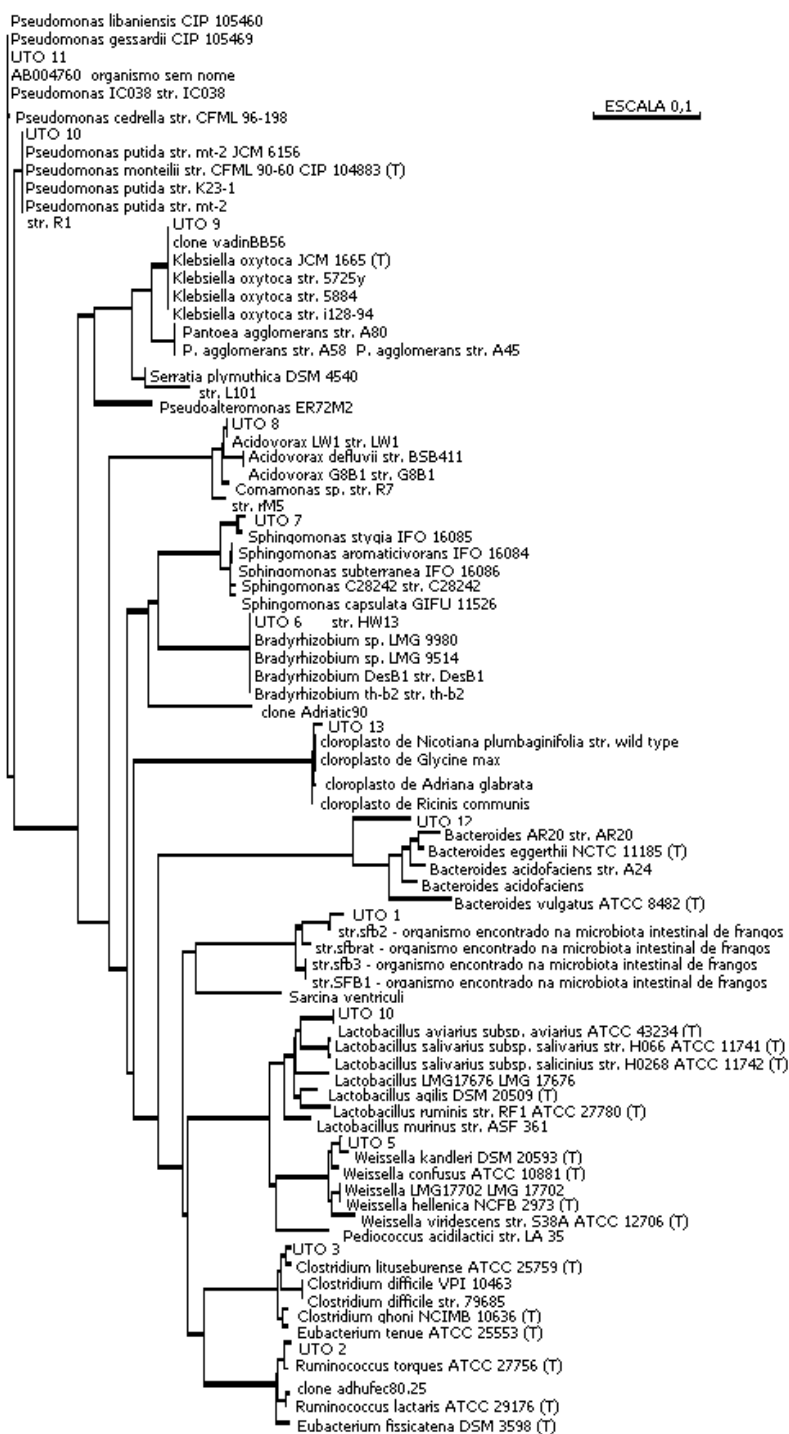


Figura 8 - Relações filogenéticas entre as UTOs identificadas no trato intestinal de frangos alimentados com dietas isentas de promotores de crescimento.

Outros dois UTOs agruparam as seqüências representando as bactérias *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas gessardii*. Os microrganismos estão relacionados com decomposição e degradação de matéria orgânica, e ao contrário de outras espécies de *Pseudomonas*, não são patogênicos (Montie, 1998). A bactéria *P. putida* têm a capacidade de utilizar fontes alternativas de C, sendo utilizada como biodegradador (Nwachukwu, 2001). É utilizada como estimulante do crescimento de vegetais (Sun et al., 1994; Sun et al. 1995), sendo o uso dessa espécie também já relatado em produtos de exclusão competitiva para animais (Corrier et al. 1995).

Entre a microbiota não descrita como patogênica do intestino delgado de frangos, observaram-se UTOs com alta homologia a *Bacteroides* AR20 str. AR20; *Clostridium lituseburense*, a qual já foi relatada como constituinte da microbiota do íleo (Lee et al., 2002) e ceco (Zhu et al., 2002) de frangos e microbiota normal do trato intestinal de suínos (Leser et al., 2002), e *Ruminococcus torques*, microrganismo relacionado a degradação de matéria orgânica, não-celulolítico encontrado na microbiota intestinal de ruminantes (Krause et al., 1999).

Somente 0,02% das seqüências obtidas representaram microrganismos que poderiam ser patogênicos oportunistas para humanos: *Acidovorax*, uma bactéria associada a degradação, anteriormente classificada no grupo *Pseudomonas*; *Sphingomonas*, que possui a capacidade de se multiplicar em diversos ambientes e está relacionado a casos de infecções por sua capacidade de crescimento até sob baixas condições nutricionais, como superfícies de materiais hospitalares, como no caso de *S. aromaticivorans* (Salkinoja-Salonen et al., 1998); *Klebsiella oxytoca* (Godon et al., 1997), um patógeno oportunista para humanos (Podschun et al., 2001); e uma bactéria não identificada, encontrado no trato intestinal de frangos (Snel et al., 1995) e relacionado a casos de infecção e abscessos.

Curiosamente, nesse estudo também foram detectadas seqüências correspondentes a cloroplastos de soja (UTO 13) que podem ter sido introduzidos no trato intestinal através da ingestão de ração. Possivelmente, havia restos de dieta, à base de farelo de soja, aderidos às vilosidades intestinais que foram coletadas no momento da raspagem do epitélio. Seqüências correspondentes a *Bradyrhizobium* (UTO 6) também foram detectadas, e sendo uma bactéria simbiótica de leguminosas, acredita-se que a ingestão também se deu pela dieta.

O número total de seqüências avaliadas foi suficiente para representar a diversidade de *Bacteria* no trato intestinal de frangos alimentados com dietas isentas de promotores de crescimento. Pela análise de rarefação pode-se observar que o número máximo de espécies esperado seria de 15 e que 500 clones seqüenciados seriam suficientes para detecta-las.

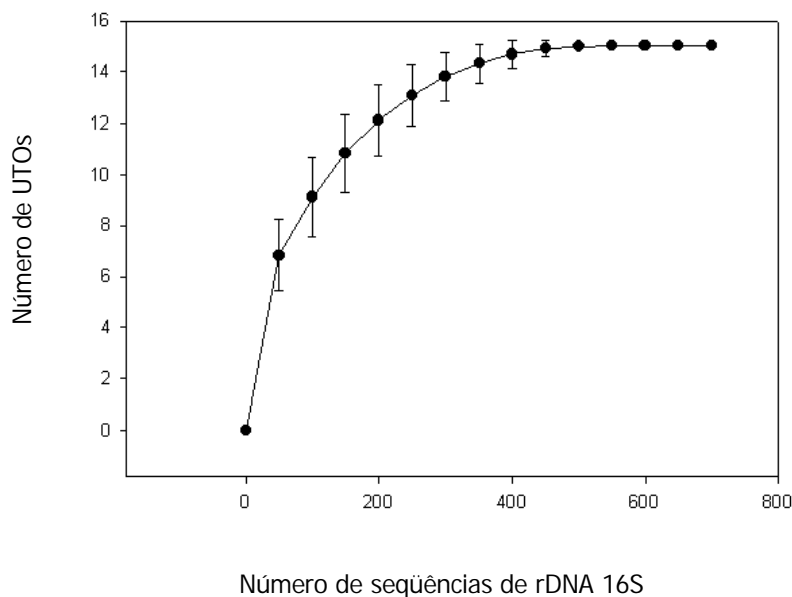


Figura 9 – Análise de rarefação de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos alimentados com dietas isentas de promotores de crescimento.

A diversidade observada na microbiota intestinal, através do seqüenciamento da biblioteca, não foi alta, já que somente foram encontrados 15 grupos filogenéticos distintos. Outros trabalhos encontraram 50 grupos filogenético no ceco de frangos (Zhu et al., 2002), 73 no ceco de poedeiras (Lan et al., 2002) e 25 no íleo de frangos (Lee, 2002). Essa diferença poderia ser esperada pelo período de jejum ao qual os animais foram submetidos, com a coleta da comunidade do epitélio intestinal aderida às vilosidades, houve diminuição considerável no número de espécies amostradas. Mas, se forem comparados os dados gerados através da biblioteca e de DGGE, observa-se uma certa discrepância. A análise do número de amplicons visualizados nos géis demonstrou que em média encontra-se 23 genótipos na microbiota de aves do grupo CON. Esse número poderia estar muito subestimado considerando-se que cada amplicon pode demonstrar mais que uma espécie. No entanto, vários desses genótipos, poderiam ser representativos da mesma espécie, e a análise filogenética não teria resolução suficiente para identifica-la.

4.1.6 Conclusões

Foram observadas alterações na estrutura da comunidade bacteriana do trato intestinal de frangos de corte criados em bateria ou sobre piso e suplementados com dietas contendo antimicrobianos.

A estrutura da comunidade bacteriana intestinal foi modificada em função do ambiente no qual a ave foi criada.

Frangos isentos de qualquer tipo de promotor de crescimento apresentaram 15 unidades taxonômicas operacionais distintas na microbiota intestinal aderida ao epitélio, predominantemente *Lactobacillus* e *Pseudomonas*.

5 EFEITO DE PROBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO PARA FRANGOS NA MICROBIOTA INTESTINAL

RESUMO

As técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e excisão de amplicons de interesse seguida de seqüenciamento, foram usadas para caracterizar mudanças na microbiota intestinal de frangos que consumiram dietas suplementadas com probióticos utilizados como promotores de crescimento. Aos 21 dias de idade, aves criadas em baterias ou sobre piso tiveram o raspado do trato intestinal coletado. O DNA total das amostras foi extraído e a região V3 do rDNA 16S foi amplificada por PCR e os amplicons resultantes analisados por DGGE. O coeficiente de similaridade (Cs) entre os perfis de *Bacteria* do intestino de frangos indicou que o fornecimento de microbiota liofilizada de aves (MICRO), a suplementação de levedura viva (LEVE) na dieta, a combinação de *Lactobacillus reuteri* e *L. johnsonii* via água de bebida mais a suplementação dietética de *Bacillus subtilis* (LA/BS), e a isenção de promotores de crescimento (CONT) para aves criadas em baterias e sobre piso não alteraram estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal. Não houve diferença significativa entre os coeficientes de similaridade da estrutura da comunidade de *Bacteria* entre os tratamentos ($P > 0,05$). Nos experimentos desenvolvidos, as seis aves que integraram cada tratamento não apresentaram variações significativas entre

as comunidades de *Bacteria* de seus intestinos avaliados pelo coeficiente de similaridade. O número de espécies encontradas na microbiota intestinal, avaliado pelo número de amplicons, foi afetado pelos probióticos quando as aves foram criadas em baterias ($P < 0,05$). Os animais recebendo LEVE apresentaram menor número de amplicons que os animais do grupo CONT ($P < 0,05$).

A análise do agrupamento hierárquico gerado com base na estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas em bateria e sobre piso mostrou que a comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos suplementados com diferentes probióticos não foi, de uma maneira geral, afetada pelo tipo de promotor de crescimento utilizado. Frangos criados em baterias e suplementados com MICRO, LA/BS e o grupo CONT apresentaram a estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal mais similares entre si do que os demais tratamentos. A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino das aves que receberam LEVE e foram criadas em bateria foram semelhantes entre si. A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino das aves que receberam LEVE, LA/BS e o grupo CONT não apresentaram diferenças entre si. Frangos criados sobre piso recebendo MICRO apresentaram a estrutura da comunidade de *Bacteria* mais similar entre si do que entre os demais tratamentos.

Poucos amplicons, visualizados quando os produtos comerciais puros foram analisados, foram observados nas amostras provenientes de raspado do epitélio das aves após a administração de probiótico. Esses dados sugerem que nas condições em que o ensaio foi conduzido, os agentes não tiveram a capacidade de colonizar o epitélio intestinal. A análise do agrupamento hierárquico das estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas em bateria e sobre piso, mostrou que aves criadas no mesmo ambiente apresentam a estrutura da comunidade de *Bacteria* semelhante, e que a

estrutura da comunidade de *Bacteria* do animal recém nascido foi mais similar a estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas em baterias. O seqüenciamento de amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* demonstrou que probióticos bacterianos puros apresentaram composição mais complexa do que informada na embalagem comercial. Os resultados demonstram que técnicas independentes do cultivo, como a PCR seguida de DGGE e seqüenciamento dos amplicons de interesse podem ser úteis para o monitoramento da estrutura da comunidade microbiana intestinal.

SUMMARY

Effect of probiotics on the intestinal microbiota of chickens

The techniques of polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and specific amplicons sequencing were used to characterize the changes in intestinal microbiota of chickens as a result of supplementation of probiotic growth promoters. At 21 days of age, chicks raised in two experiments conducted in batteries or in floor pens had the small intestine mucosa scraped, the total DNA extracted, the V3 region of 16S rDNA amplified by PCR and analyzed by DGGE. The analysis of amplicons patterns indicated that the supplementation of lyophilized poultry microbiota (MICRO) in the water, or live yeast (YEAST) in the feed, or the combination of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus johnsonii* in the water plus *Bacillus subtilis* in the feed (LA/BS), or unsupplemented diets (CONT) did not differ significantly. The six replicates birds from each treatment did not show significant individual differences. The number of species found in the intestinal microbiota, evaluated by the number of amplicons, was affected by probiotics when the birds were raised in batteries ($P < 0.05$). YEAST resulted in lower number of amplicons than CONT ($P < 0.05$). The hierarchical clustering produced from samples obtained in

chickens of different treatments raised in floor pens indicated that the probiotics did not result in distinct branching. The intestinal ecosystem of birds was little modified by the probiotics when chickens were raised in batteries. Few amplicons encountered in the commercial products analyzed were observed in the samples scraped from the gut after probiotic supplementation. Under the experimental conditions adopted, the probiotics did not show the ability to colonize the intestinal epithelium. Samples analyzed considering the two rearing systems showed a pattern of branches specific for each environment. A newborn chick tested revealed greater similarity to birds raised in batteries than in the pens. The pure bacterial probiotics showed composition more complex than informed in labels. These results demonstrate that techniques independent of culture, such PCR followed by DGGE combined to measure of ecological diversity may be useful in monitoring the intestinal microbiota resulting from feeding probiotics.

5.1 Introdução

Promotores de crescimento tradicionais adotados na avicultura, como antibióticos, ultimamente têm sido menos utilizados. Nos Estados Unidos, em 1995, aproximadamente 94, 98 e 75%, das dietas iniciais, de crescimento e terminação, respectivamente, continham antibiótico; em 2000 o percentual declinou para 64, 66 e 48% (Chapman et al. 2002). Em contrapartida o interesse nos chamados promotores de crescimentos alternativos tem aumentado. Produtos como ácidos orgânicos, prebióticos, simbióticos e probióticos têm sido comercializados como substitutos aos promotores de crescimento tradicionais. Os probióticos podem beneficiar o hospedeiro por competir com patógenos por sítios de ligação no epitélio intestinal (Morishita et al., 1997), além de melhorar a digestão e absorção de nutrientes (Schenbach, 1989) e o desempenho do animal (Santin et al., 2000, Maiorka et al, 2001).

Estes produtos apresentam-se no mercado com uma vasta gama de constituintes, desde *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e até leveduras. Vários testes são recomendados para averiguar a eficácia de um probiótico, dentre eles, a funcionalidade *in vivo*. Para beneficiar o animal, um microrganismo probiótico deve estabelecer-se na microbiota do trato intestinal resistindo ao pH do meio e multiplicando-se satisfatoriamente (Netherwood, 1999). É importante que os probióticos possuam a habilidade de aderir ao epitélio intestinal. Especula-se que microrganismos aderidos à mucosa do trato intestinal podem atuar como uma barreira física contra a ação de patógenos (Stern et al., 1995; Zhu et al., 2002).

Existe um delicado balanço entre a microbiota intestinal e a fisiologia do hospedeiro. Fatores como estresse, dieta e ambiente de criação podem afetar o perfil de microrganismos existentes no trato intestinal (Gibson et al., 2000). O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações pode ser útil para o estabelecimento de estratégias de desenvolvimento de probióticos mais eficientes e promover a melhora em índices zootécnicos.

Para que a avaliação da composição da microbiota normal aderida seja bem sucedida não se recomenda a coleta e análise das excretas. Recentemente foi demonstrado, por técnicas independentes de cultivo, que a comunidade das bactérias associadas ao epitélio é diferente daquela encontrada nas fezes (Zoetendal, et al. 2002). O mais indicado é o sacrifício do animal e coleta de raspado da mucosa, ou biópsia no caso de impossibilidade do abate.

Além da dificuldade de avaliação de um probiótico com base no critério de prevalência, técnicas tradicionais de identificação de microrganismos não avaliaram a população total presente no ecossistema, pois se baseiam em meios de cultivo seletivos e microscopia. Tem sido observado que a maior parte da microbiota detectada por microscopia não pode ser cultivável (Tannock et al., 2000). Como alternativa, técnicas moleculares oferecem novas oportunidades

para a análise da estrutura da comunidade microbiana não cultivável (Muyzer et al., 1993). A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos de rDNA 16S produzidos pela amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), tem demonstrado ser ferramenta útil na análise de comunidades microbianas. De uma maneira geral, o DNA total do habitat de interesse é extraído e uma região hipervariável do rDNA 16S é amplificada por PCR. Os fragmentos de DNA com mesmo tamanho, mas com conteúdo de C + G diferentes podem ser separados sem um gradiente de desnaturação, gerando um perfil genotípico da comunidade. Para que as espécies da comunidade sejam identificadas é necessária a excisão do gel a ser seqüenciado (Lesser et al., 2002). Análises filogenéticas podem ser realizadas, comparando-se a seqüência obtida com seqüências depositadas em bancos de dados públicos. A técnica possibilita que seja feita somente a avaliação dos amplicons de interesse, sendo menos onerosa do que a construção de bibliotecas de rDNA 16S.

O ambiente no qual o animal é criado pode modificar a microbiota intestinal (Gibson et al., 2000). Frangos criados em piso sobre cama podem apresentar comunidades microbianas com estruturas diferentes das de aves criadas em baterias, devido às condições de acesso ao material da cama e ingestão de partículas de excretas.

O objetivo desse estudo foi avaliar a prevalência de microrganismos, utilizados como probióticos, no epitélio do trato intestinal de frangos e se os mesmos tem a capacidade de alterar a estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal das aves, através da técnica de PCR seguida de DGGE e seqüenciamento dos amplicons de interesse.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Animais experimentais

Foram conduzidos dois experimentos com frangos de corte utilizando probióticos. O delineamento adotado em todos os experimentos foi em blocos casualizados com seis repetições por tratamento. Os tratamentos adotados foram suplementação de 400 mg de levedura viva (BIOSAF[®]) por quilo de dieta, 0,0625 mg/L de microflora de aves saudáveis (AVIGUARD[®]) via água de bebida, a combinação de 0,05 mg/L de *Lactobacillus reuteri* e *L. acidophilus* (FINELACT[®]) via água de bebida e 300 mg de *Bacillus subtilis* (CALSPORIN[®]) por quilo de dieta mais o grupo isento de promotores de crescimento.

O experimento 1 foi conduzido em baterias metálicas, em sala climatizada, onde foram alojadas 288 aves, 12 aves por unidade experimental. O experimento 2 foi conduzido em galpão de alvenaria sobre piso. Foram utilizadas 1.200 aves no total, sendo cada parcela de 50 animais, alojada em box de 4,5 m². Ao final dos experimentos, aos 21 dias de idade dos animais, após jejum de seis horas, uma ave por parcela foi sacrificada por deslocamento cervical, o trato gastrintestinal exposto, e o intestino delgado coletado. Com o auxílio de uma lâmina cirúrgica estéril descartável, a mucosa do duodeno, jejuno e íleo foi exposta, o material coletado, envasado em microtubos estéreis e mantido a -80°C até o momento do processamento.

5.2.2 Extração do DNA total

O raspado da mucosa do intestino delgado das aves foi homogeneizado e uma alíquota de 100 mg retirada. O DNA total da amostra foi extraído utilizando-se o kit FastDNA Spin (Bio 101, Vista, Califórnia), de acordo com as instruções do fabricante. A microtubos de 1,5 mL foi adicionado 1 mL de solução CLS-TC (solução de lise celular para tecidos animais e bactérias), 100 mg de amostra e um cilindro plástico de ¼ de polegada. Os tubos foram

agitados, horizontalmente, por 10 s a 4 m s^{-1} , em um homogeneizador FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Bio 101, Vista, Califórnia). Em seguida, centrifugou-se por 5 min a 13000 *g*; 600 μL do sobrenadante foi transferido para um microtubo limpo e adicionado 600 μL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 1 min por inversão. Os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente, e centrifugados por 30 s em velocidade mínima. O sobrenadante foi descartado. O pélete foi resolubilizado em 500 μL de solução de lavagem (SEWS) e a solução incubada por 1 min à temperatura ambiente. A solução foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo, o conjunto foi centrifugado duas vezes por 1 min a 13000 *g*. Os filtros foram transferidos para microtubos limpos, onde foi adicionado 100 μL de solução DES a matriz de ligação. Incubou-se por 5 min a temperatura ambiente, e centrifugou-se por 5 min a 13000 *g*. Os filtros foram descartados e a solução de DNA coletada. A integridade do DNA total foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,0% - 0,5X TBE (1X TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8) e densitometria, utilizando-se um densitrômetro laser FluorImage (Amershan Biosciences) e o programa Fragment Analyses (Amershan Biosciences). A quantificação do DNA foi feita usando como padrão o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O DNA foi armazenado a -20°C .

5.2.3 PCR

Para a amplificação de fragmentos específicos da região V3 do rDNA 16S de microrganismos de domínio *Bacteria* utilizou-se o seguinte conjunto de iniciadores: BA338fCG (5´ CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG 3´) e UN518r (5´ ATT ACC GCG GCT GCT GG 3´) (Ovreas et al., 1997). Em solução contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 5 pmol de cada iniciador, 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 5 μL do tampão da reação 10X e 25 ng de DNA. O DNA foi adicionado após desnaturação inicial a 95°C . A amplificação foi realizada em um termociclador

Mastercycler Gradient (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 5 min a 95°C; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, pareamento à 55°C por 1 min e extensão a 72°C durante 1 min; extensão final à 72°C durante 10 min. Uma alíquota dos produtos de PCR (amplicons) foi analisada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% - 0,5X TBE e densitometria conforme descrito acima.

5.2.4 DGGE

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante. Os géis de 8% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1; m:m) foram preparados com gradiente desnaturante variando de 15 a 55%, usando duas soluções: solução 100% de desnaturação contendo 40% (vol/vol) formamida e 7 M uréia, e solução 0% de desnaturação sem uréia ou formamida (Ovreas et al., 1997). A DGGE foi realizada utilizando-se o equipamento DCode (BioRad) em géis de 16 x 16 x 0,1 cm e tampão TAE 0,5X (1X TAE: 40 mM Tris acetato e 1 mM EDTA). Quantidades iguais (500 ng) do produto de PCR foram utilizadas. A eletroforese foi realizada a 200V e 60°C durante 4 h. Os géis foram fixados com ácido acético 10% por 20 min, lavados com água desionizada três vezes, imersos em metanol 50% por 20 min, novamente lavados com água desionizada e corados com SYBR Green I (0,1 µL/mL) por 30 min. Após a coloração, os géis foram analisados utilizando-se um densitômetro laser FluorImage (Amershan Biosciences) e o programa Fragment Analyses (Amershan Biosciences).

5.2.5 Excisão dos amplicons a partir do gel de poliacrilamida

Amplicons de interesse identificados após DGGE, foram excisados do gel com lâmina estéril de bisturi cirúrgico. Cada fragmento contendo uma banda de DNA foi rapidamente lavado com 100 µL de água desionizada esterilizada e eluído em 20 µL de água desionizada esterilizada por 16 horas à 4°C. Um

microlitro do DNA eluído de cada amplicon de DGGE foi reamplificado seguindo as condições já descritas (item 4.2.3). Uma alíquota foi analisada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% - 0,5X TBE. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR Green e densitometria, utilizando-se um densitômetro laser FluorImage (Amershan Biosciences). Os amplicons foram purificados utilizando-se o kit S.N.A.P. Purification System (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante e seqüenciados.

5.2.6 Seqüenciamento dos amplicons de rDNA 16S

A amplificação por PCR foi feita com a enzima AmpliTaq polimerase e "BigDye terminator" (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando-se o iniciador UN518r (item 5.2.3). O seqüenciamento foi feito em seqüenciador capilar Applied Biosystems, modelo 3100, conforme recomendações do fabricante.

5.2.7 Análise dos dados

Os perfis de amplicons, após separação por DGGE, foram comparados usando o coeficiente de similaridade de concordância simples (simple matching), definido por:

$$Cs = (a + d) (a + b + c + d)^{-1}$$

Onde:

Cs = índice de similaridade entre a amostra i e j,

a = número de amplicons comuns às amostras i e j,

b = número de amplicons presentes na amostra i,

c = número de amplicons presentes na amostra j,

d = número de amplicons diferentes nas amostras i e j.

A análise de variância do número de amplicons foi realizada utilizando-se o procedimento General Linear Models do SAS (1998), e as médias foram

comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Também foi efetuada a análise do Cs dentro de tratamentos, para averiguar se existem diferenças entre as seis repetições seguindo o mesmo procedimento.

Dados binário determinados pela presença ou ausência dos amplicons detectados nas diferentes amostras, foram utilizados para a análise de agrupamento hierárquico, através do programa SYSTAT 8.0 (1996), utilizando o algoritmo de Ward para ligação e distância em porcentagem como unidade de medida.

5.2.8 Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram processadas para remoção de vetor contaminante e bases de baixa qualidade (índice de qualidade < 20) utilizando-se os programas Phred/Phrap. As seqüências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTO) utilizando-se o programa CAP3. A seqüência consenso de cada UTO foi comparada com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (RDP Project) para identificação da espécie bacteriana.

5.3 Resultados e discussão

Em levantamento bibliográfico foi observado que trabalhos com aves, que fizeram uso de técnicas moleculares, tiveram como foco do estudo o ceco de frangos de corte (Wielen et al., 2000; Apajalahti et al., 2001; Zhu et al., 2002) e de galinhas poedeiras adultas (Lan et al. 2002). Outra pesquisa avaliou a mistura do conteúdo do papo, duodeno e ceco (Nethewood et al., 1999). Apesar da região ser apontada como problemática na exploração de frangos de corte, pois pode abrigar grande parte das bactérias potencialmente prejudiciais a saúde humana, o intestino delgado também deve ser foco de pesquisas. As únicas pesquisas que avaliaram parcialmente o intestino delgado de frangos, o íleo, foram desenvolvidas por Knarreborg et al.(2002) e Lee et al. (2002).

Devido a pouca quantidade de informações publicadas optou-se por estudar as três porções do intestino delgado, duodeno, jejuno e íleo. Amostras foram coletadas sem que fosse feita distinção entre as regiões, para que a mesma representasse o intestino delgado como um todo.

A microbiota aderida ao epitélio difere daquela dispersa no lúmen intestinal e a separação desses materiais pode não ser tão eficiente quando efetuada em laboratório (Zhu et al., 2002). Por esta razão optou-se por manter as aves que integraram o experimento em jejum nas horas que antecederam seu abate, para que de fato pudesse ser coletado somente a microbiota aderida ao tecido epitelial. Acredita-se que a microbiota aderida ao trato pode conferir proteção física contra a penetração de patógenos (Stern et al., 1994; Zhu et al., 2002), os quais podem deprimir o desempenho em aves, além de estar relacionada diretamente a produção de fatores digestivos e metabólicos (Krause et al., 1999). Também, procurou-se eliminar o efeito da dieta com organismos probióticos, para que de fato fossem coletados somente os microrganismos aderidos às vilosidades e não os dispersos no lúmen, os quais foram ingeridos com a dieta e se encontravam em concentração elevada.

5.3.1 DGGE

A composição da microbiota intestinal tem sido detectada através do uso de técnicas de cultivo *in vitro* e microscopia (Walter et al., 2001). Acredita-se que somente 20% da comunidade de bactérias intestinais podem ser acessadas utilizando-se o cultivo em meios seletivos (Langendijk et al., 1995; Suau et al., 1999; Vaughan et al., 2000). Na década de 70, com o uso de meios seletivos artificiais, foi diagnosticado que a microbiota intestinal de aves era composta de, em média, 400 espécies bacterianas (Moore et al., 1974). Atualmente, através de métodos moleculares de identificação de microrganismos o panorama é outro. Em experimento recente (Zhu et al., 2002) utilizando

técnicas moleculares identificou 243 organismos diferentes somente no ceco de frangos. Possivelmente a diversidade total do intestino seja maior do que a observada por Moore et al. (1974).

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, através da análise do DGGE, pode-se observar um número máximo de 137 amplicons em experimento conduzido em bateia (Figura 1) e de 144 em experimento conduzido sobre piso (Figura 2). A análise simultânea de amostras representativas oriundas das aves criadas em galpão e sobre piso (Figura 3) revelou 149 amplicons diferentes. O número de amplicons encontrado é inferior ao número de espécies bacterianas prevista, com base com base na literatura. Essa subestimação já foi apontada por alguns autores como sendo intrínsecas das limitações do DGGE (Cury, 2000). Amplicons de baixa abundância poderiam não ser detectados pela metodologia adotada, principalmente quando a espécie representa menos que 1% da população total (Muyzer et al., 1989). Além do mais os amplicons podem um grupo de espécies com conteúdo de C + G similares, o que resultaria em comigração dos amplicons (Simpson et al., 1999).

Tabela 1. Número médio de amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), ou isentos de promotores de crescimento (CONT).

TRATAMENTO	BATERIA	PISO
LEVE	29,00 b	27,83 a
MICRO	31,50 ab	26,83 a
BS/LA	31,67 ab	28,50 a
CONT	37,00 a	23,83 a
CV (%)	11,65	18,46

a, b - médias seguidas de letras diferentes, dentro das mesmas condições de criação, diferem estatisticamente (Tukey, $P < 0,05$)

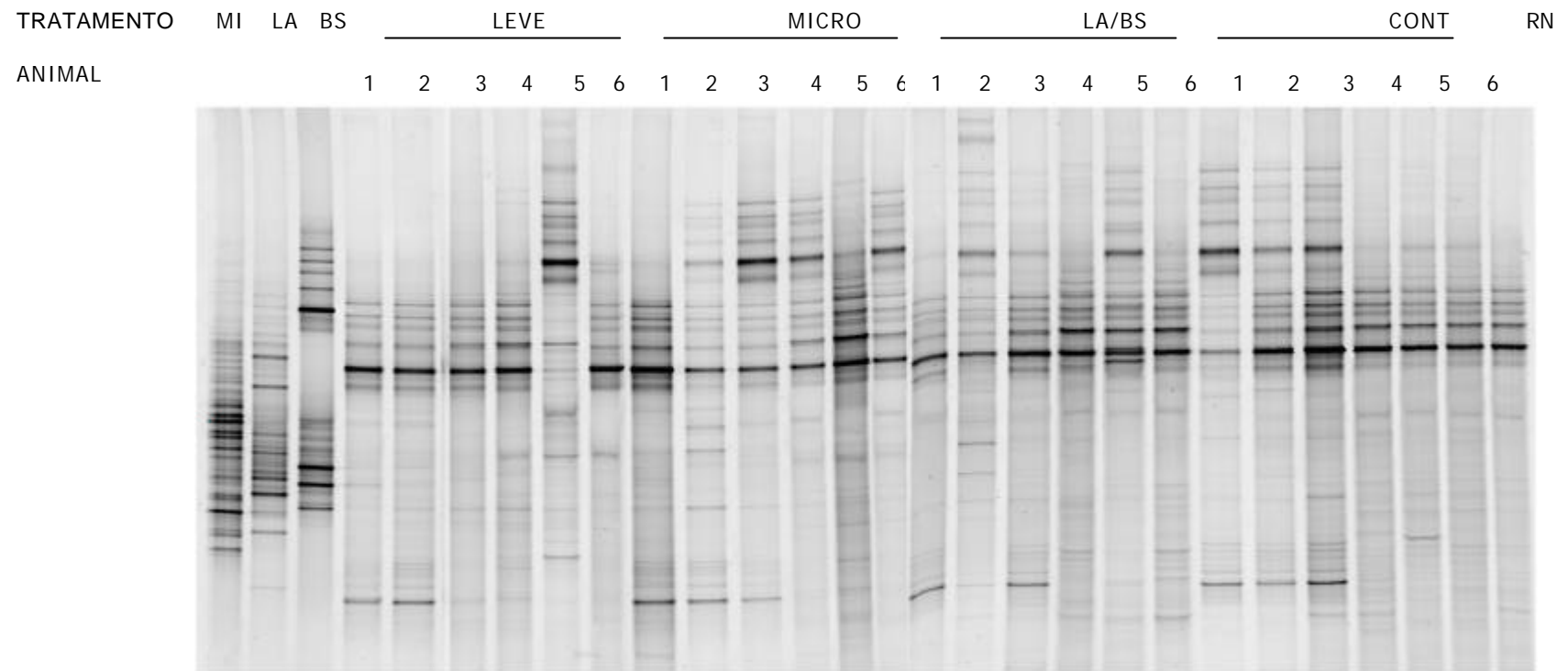


Figura 1 - DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT), o animal recém nascido (RN) e os probióticos bacterianos: microbiota (MI), *L. johnsonii* e *L. reuteri* (LA) e *B. subtilis* (BS) utilizados (Experimento 1).

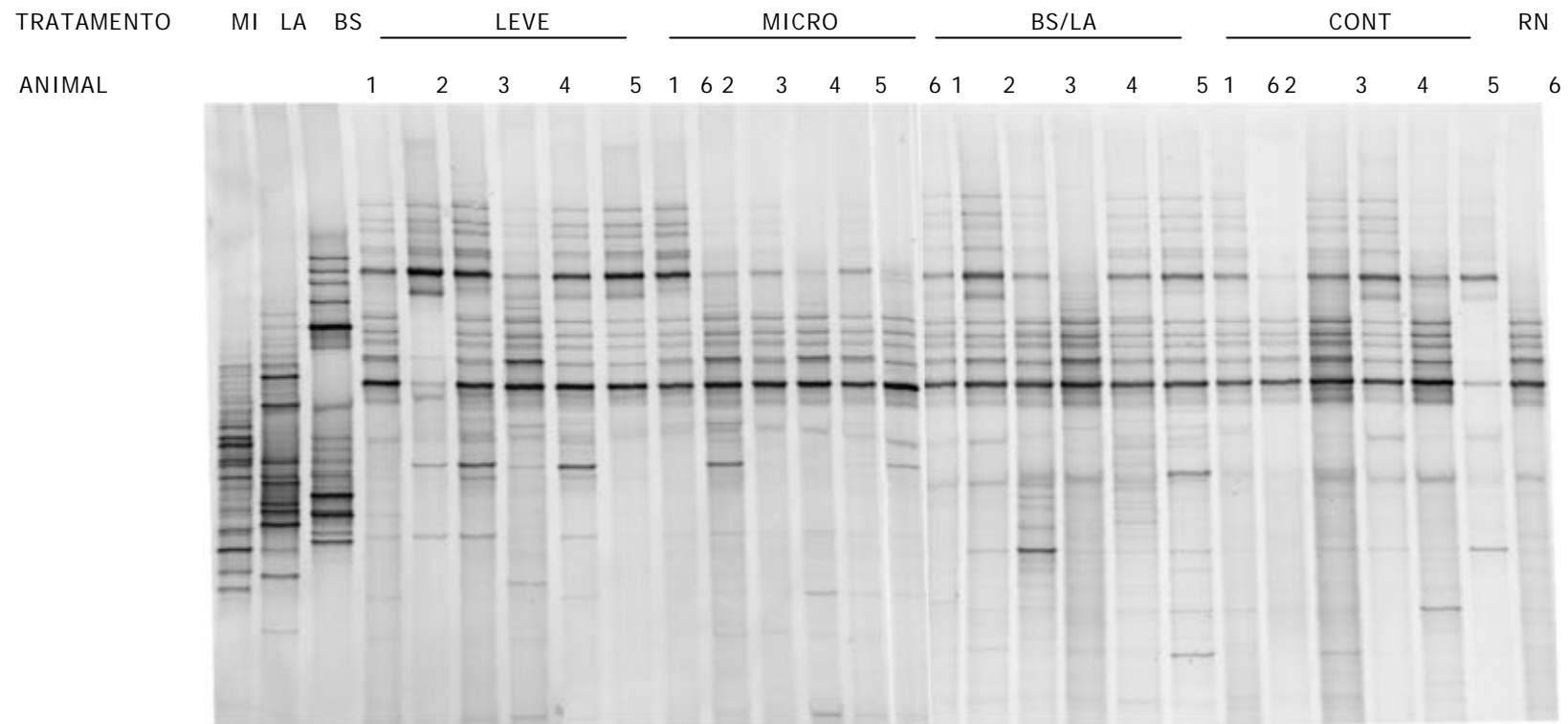


Figura 2 - DGGE de amplicons da região V3 do rDNA de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em sobre piso e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT), o animal recém nascido (RN) e os probióticos bacterianos: microbiota (MI), *L. johnsonii* e *L. reuteri* (LA) e *B. subtilis* (BS) utilizados (Experimento 2).

AMBIENTE	BATERIA								PISO				
TRATAMENTO	MI	LA	BS	LEVE	MICRO	LA/BS	CONT	LEVE	MICRO	LA/BS	CONT	RN	

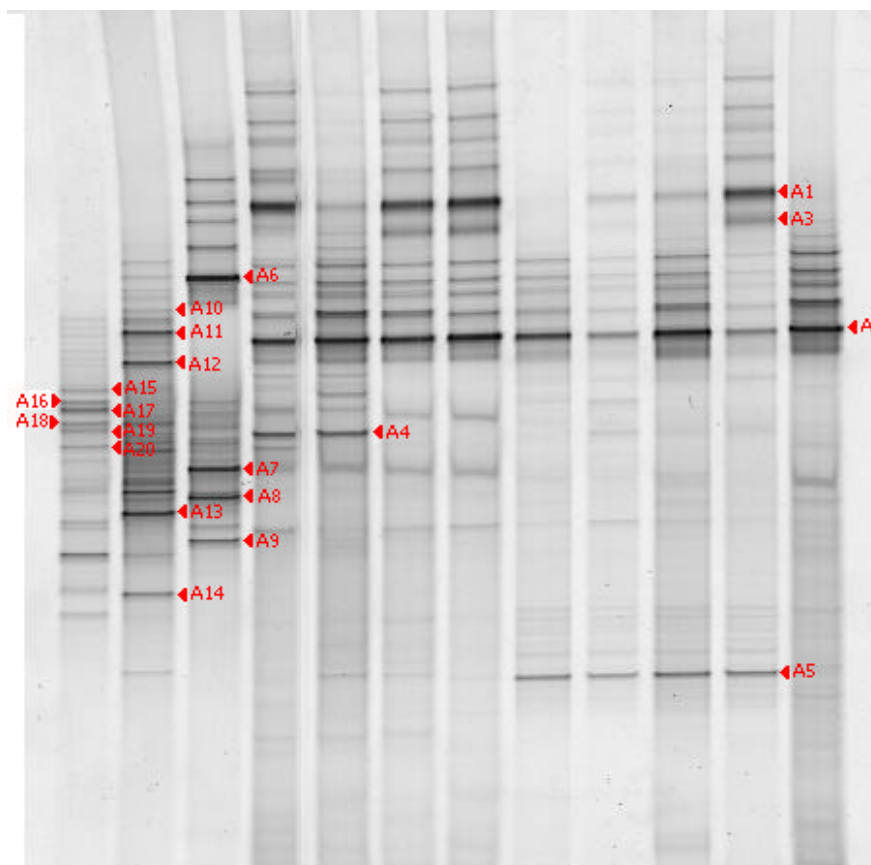


Figura 3 - DGGE com os perfis de amplicons da região V3 do rDNA 16S do trato intestinal de frangos criados em baterias (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), o grupo isento de promotores de crescimento (CONT), o animal recém nascido (RN) e os probióticos bacterianos: microbiota (MI), *L. johnsonii* e *L. reuteri* (LA) e *Bacillus subtilis* (BS). As setas em vermelho indicam quais amplicons foram excisados.

Os números médios de amplicons das amostras oriundas de frangos criados em baterias e sobre piso são apresentados na Tabela 1. Em aves criadas em bateria, o número médio de amplicons visualizados nos géis diferiu significativamente entre os tratamentos ($P < 0,05$). As aves que receberam LEVE apresentaram um número menor de amplicons se comparados ao grupo CONT. A suplementação de levedura viva foi adotada em função do microrganismo ser um agente de expressiva comercialização no mercado. No entanto, as leveduras não podem ser detectadas através da metodologia usada, devido a especificidade de iniciadores adotados para amplificar o rDNA. Na presente situação, a levedura viva pode ter excluído algumas bactérias do epitélio intestinal para, por competição espaço, tomar o lugar das mesmas, já que o número de amplicons detectados, em relação ao grupo CON foi menor. A mesma situação não se repetiu quando o experimento foi conduzido com as aves criadas em piso, onde, teoricamente, encontra-se uma situação de desafio mais intenso. Talvez o acesso à cama e a todos os microrganismos que podem ser encontrados na mesma, tenha diminuído o número de nichos próprios para as leveduras, dificultando seu estabelecimento no intestino.

Os coeficientes de similaridade entre as estruturas das comunidades de *Bacteria* do trato intestinal de aves criadas em baterias ou sobre piso são apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. O coeficiente de similaridade foi adotado para uma avaliação das diferenças que poderiam existir entre as seis aves que representaram cada uma das unidades experimentais que compuseram cada tratamento. Não houve diferença significativa entre aves submetidas a mesma suplementação probiótica quando as mesmas foram criadas em baterias ou sobre piso (Tabela 4). Esse dado é útil, pois o número de repetições adotados em experimentos que fazem uso de técnicas moleculares é muito discutido. Muitas críticas são feitas quando as análises são feitas a partir de amostras compostas, uma amostra que conteria a mistura de todas as

Tabela 2. Coeficientes de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus johnsonii* e *L. reuteri* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT) e o animal recém nascido (RN).

		LEVE						MICRO						BS/LA						CONT					
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
LEVE	(2)	0,985																							
	(3)	0,794	0,809																						
	(4)	0,794	0,809	0,853																					
	(5)	0,588	0,603	0,647	0,618																				
	(6)	0,809	0,794	0,838	0,779	0,691																			
	MICR	(1)	0,838	0,824	0,691	0,721	0,662	0,794																	
(2)		0,765	0,750	0,647	0,706	0,735	0,750	0,838																	
(3)		0,735	0,721	0,647	0,706	0,706	0,750	0,809	0,971																
(4)		0,676	0,691	0,735	0,735	0,824	0,809	0,721	0,882	0,882															
(5)		0,632	0,647	0,721	0,779	0,721	0,735	0,706	0,779	0,779	0,838														
(6)		0,662	0,676	0,721	0,809	0,721	0,735	0,735	0,809	0,809	0,838	0,971													
BS/LA	(1)	0,750	0,735	0,662	0,721	0,632	0,765	0,853	0,897	0,926	0,809	0,765	0,794												
	(2)	0,632	0,618	0,603	0,603	0,779	0,676	0,706	0,838	0,838	0,838	0,706	0,735	0,794											
	(3)	0,765	0,750	0,706	0,765	0,706	0,779	0,838	0,941	0,941	0,853	0,838	0,868	0,897	0,779										
	(4)	0,676	0,662	0,735	0,676	0,647	0,691	0,662	0,706	0,706	0,735	0,750	0,750	0,721	0,662	0,735									
	(5)	0,632	0,647	0,691	0,691	0,662	0,647	0,735	0,809	0,779	0,750	0,824	0,824	0,794	0,706	0,809	0,750								
	(6)	0,632	0,618	0,721	0,662	0,662	0,706	0,706	0,721	0,721	0,750	0,735	0,765	0,735	0,706	0,750	0,897	0,765							
CONT	(1)	0,721	0,735	0,721	0,750	0,691	0,676	0,765	0,838	0,838	0,779	0,765	0,794	0,794	0,706	0,897	0,691	0,794	0,706						
	(2)	0,750	0,765	0,632	0,691	0,691	0,647	0,765	0,838	0,809	0,750	0,735	0,765	0,765	0,676	0,868	0,632	0,765	0,647	0,912					
	(3)	0,721	0,735	0,691	0,721	0,662	0,676	0,735	0,838	0,838	0,809	0,765	0,794	0,794	0,706	0,868	0,721	0,765	0,706	0,912	0,882				
	(4)	0,706	0,721	0,706	0,706	0,647	0,691	0,779	0,794	0,794	0,765	0,838	0,838	0,779	0,691	0,824	0,765	0,809	0,779	0,779	0,868				
	(5)	0,706	0,691	0,706	0,735	0,647	0,721	0,779	0,824	0,824	0,794	0,809	0,838	0,809	0,779	0,853	0,735	0,809	0,779	0,809	0,750	0,809	0,824		
	(6)	0,721	0,706	0,662	0,721	0,632	0,706	0,794	0,838	0,838	0,779	0,824	0,824	0,824	0,735	0,868	0,779	0,824	0,765	0,794	0,794	0,882	0,926	0,897	
RN	0,794	0,779	0,794	0,794	0,559	0,838	0,809	0,735	0,735	0,706	0,779	0,779	0,779	0,691	0,794	0,706	0,721	0,721	0,721	0,662	0,721	0,824	0,824	0,838	

Os dados são referentes ao Experimento 1.

Os números entre parênteses são referentes aos indivíduos avaliados.

Tabela 3. Coeficiente de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados sobre piso e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT) e o animal recém nascido (RN).

		LEVE						MICRO						BS/LA						CONT					
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
LEVE	(2)	0,706																							
	(3)	0,868	0,632																						
	(4)	0,809	0,632	0,824																					
	(5)	0,779	0,750	0,853	0,735																				
	(6)	0,838	0,779	0,794	0,765	0,853																			
	MICRO	(1)	0,912	0,676	0,926	0,809	0,838	0,809																	
(2)		0,824	0,647	0,868	0,809	0,838	0,750	0,882																	
(3)		0,926	0,691	0,882	0,824	0,794	0,853	0,868	0,809																
(4)		0,809	0,544	0,824	0,824	0,676	0,706	0,779	0,750	0,853															
(5)		0,912	0,647	0,868	0,838	0,750	0,809	0,853	0,794	0,926	0,838														
(6)		0,779	0,574	0,765	0,735	0,706	0,735	0,809	0,750	0,794	0,853	0,809													
BS/LA	(1)	0,809	0,662	0,794	0,853	0,765	0,824	0,838	0,779	0,824	0,794	0,809	0,794												
	(2)	0,853	0,676	0,838	0,868	0,779	0,838	0,853	0,824	0,868	0,809	0,853	0,809	0,959											
	(3)	0,765	0,676	0,779	0,809	0,779	0,750	0,794	0,794	0,779	0,750	0,794	0,721	0,868	0,882										
	(4)	0,676	0,471	0,691	0,691	0,632	0,603	0,735	0,794	0,662	0,750	0,676	0,721	0,691	0,735	0,706									
	(5)	0,809	0,515	0,794	0,676	0,706	0,647	0,779	0,750	0,794	0,676	0,779	0,618	0,676	0,721	0,662	0,662								
	(6)	0,838	0,632	0,853	0,824	0,735	0,765	0,868	0,809	0,853	0,794	0,868	0,794	0,853	0,868	0,838	0,691	0,706							
CONT	(1)	0,956	0,691	0,853	0,794	0,765	0,824	0,868	0,809	0,941	0,824	0,926	0,794	0,853	0,897	0,809	0,691	0,824	0,882						
	(2)	0,721	0,544	0,735	0,676	0,706	0,706	0,779	0,721	0,735	0,794	0,750	0,853	0,794	0,779	0,721	0,750	0,647	0,735	0,765					
	(3)	0,853	0,618	0,809	0,809	0,721	0,750	0,824	0,824	0,809	0,750	0,824	0,721	0,809	0,853	0,794	0,706	0,721	0,838	0,838	0,662				
	(4)	0,794	0,706	0,721	0,779	0,750	0,838	0,735	0,706	0,809	0,691	0,824	0,721	0,838	0,882	0,765	0,647	0,691	0,750	0,838	0,750	0,735			
	(5)	0,794	0,588	0,750	0,750	0,691	0,721	0,794	0,735	0,779	0,750	0,794	0,750	0,750	0,765	0,735	0,647	0,691	0,838	0,809	0,691	0,794	0,706		
	(6)	0,794	0,706	0,750	0,721	0,779	0,868	0,765	0,735	0,809	0,721	0,824	0,750	0,779	0,824	0,765	0,676	0,691	0,779	0,838	0,750	0,735	0,824	0,765	
RN	0,721	0,485	0,735	0,794	0,618	0,647	0,721	0,750	0,735	0,853	0,750	0,794	0,765	0,809	0,750	0,809	0,647	0,765	0,735	0,794	0,779	0,721	0,750	0,750	

Os dados são referentes ao Experimento 2.

Os números entre parênteses são referentes aos indivíduos avaliados.

repetições de um mesmo tratamento. Os dados obtidos demonstram que, neste experimento, uma amostra composta poderia ter sido utilizada sem prejuízo para as avaliações subsequentes. A alta similaridade apresentada entre as amostras pode ter sido obtida em função da espécie animal utilizada nos ensaios. Em experimentos que fizeram o uso de outras espécies, como roedores, suínos e humanos as diferenças entre as comunidades experimentais são significativas (McCartney et al., 1996, Kimura et al., 1997, Zoetendal, 1998, Simpson et al., 2000, McCracken et al., 2002). Nas nossas condições, as aves utilizadas nos experimentos foram provenientes de um único incubatório, sendo suas matrizes criadas em um mesmo lote, submetidas ao mesmo programa alimentar, sanitário e de manejo. Talvez este aspecto tenha propiciado o desenvolvimento de comunidades microbianas similares entre as unidades experimentais, o que não ocorre com roedores, suínos e é praticamente impossível que ocorra com humanos.

Tabela 4. Coeficiente de similaridade entre as estruturas das comunidades de *Bacteria* do trato intestinal de frangos, de cada unidade experimental, criados em baterias (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com levedura viva (LEVE), microbiota liofilizada (MICRO), *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* e *Bacillus subtilis* (LA/BS) e isentos de promotores de crescimento (CONT).

Repetição	BATERIA				PISO			
	LEVE	MICRO	BS/LA	CONT	LEVE	MICRO	BS/LA	CONT
1	0,901 a	0,882 a	0,898 a	0,920 a	0,914 a	0,923 a	0,919 a	0,917 a
2	0,904 a	0,929 a	0,869 a	0,911 a	0,870 a	0,902 a	0,931 a	0,873 a
3	0,898 a	0,926 a	0,901 a	0,935 a	0,911 a	0,929 a	0,890 a	0,885 a
4	0,889 a	0,923 a	0,881 a	0,917 a	0,897 a	0,917 a	0,866 a	0,906 a
5	0,819 a	0,908 a	0,886 a	0,908 a	0,911 a	0,932 a	0,863 a	0,885 a
6	0,895 a	0,917 a	0,889 a	0,929 a	0,917 a	0,911 a	0,913 a	0,908 a
CV (%)	5,42	4,28	3,62	3,21	3,49	2,61	4,31	2,84

a - médias seguidas de letras iguais, num mesmo tratamento, diferem estatisticamente (Tukey, $P > 0,05$).

A grande maioria dos amplicons detectados nos agentes probióticos puros não foram detectados no trato intestinal das aves tratadas com os mesmos. Isto indica que os microrganismos probióticos não tiveram a capacidade de colonizar, multiplicar e fixar-se na parede do epitélio intestinal. Talvez os microrganismos probióticos tenham permanecido livres na luz intestinal, mas como as aves passaram por um período de jejum e antes da amostragem e as amostras foram obtidas a partir de raspados da mucosa, essa hipótese não pode ser confirmada. Há de se considerar também que o tratamento MICRO foi aplicado somente no primeiro dia de vida das aves.

A microbiota liofilizada pura apresentou um padrão de migração de amplicons muito divergente do observado nas amostras oriundas das aves que compuseram os experimentos. É recomendável que um probiótico seja espécie-específico para que este manifeste o seu potencial (Gilliland et al., 1980, Buck et al., 1994). Pesquisando a utilização de probiótico que foi desenvolvido para frangos em patos, Impey et al. (1984) observaram que o mesmo não foi efetivo. Da mesma forma, ratos e camundongos não são considerados bons modelos para testes de probióticos para humanos pois podem existir diferenças na microbiota intestinal (Gibson et al., 2000). Possivelmente, a exemplo do que ocorre com roedores e humanos, a espécie a partir da qual o probiótico foi obtido pode determinar a eficiência do agente. Desafortunadamente, não é especificado pelo fabricante qual categoria de ave foi a doadora da microbiota. É somente citado que o produto se destina a galinhas de postura, frangos de corte, reprodutoras e perus.

A mistura de *Lactobacillus* bem como o *B. subtilis* apresentaram um número maior de amplicons do que o esperado, já que no invólucro comercial é descrito que a mistura de *Lactobacillus* é composta de apenas dois agentes (*L. reuterii* e *L. johnsonii*) e maltodextrina como veículo e o segundo, *B. subtilis* e veículo. Porém é sabido que muitas bactérias possuem mais de uma cópia do

rDNA 16S, os quais podem apresentar mobilidade diferente no DGGE, resultando em múltiplas bandas da mesma espécie bacteriana (Nubel et al., 1996; Boon et al., 2000). Também é possível que os outros organismos detectados por DGGE tenham sido introduzidos no produto no momento do processamento, na ocasião da adição do veículo ou mesmo no campo no momento da abertura dos sachês e coleta da alíquota. A abertura e coleta, propositadamente, não foi feita em condições de esterilidade pois o objetivo foi simular uma situação de campo.

O animal recém nascido apresentou uma estrutura de comunidade de *Bacteria* avaliada por DGGE similar a estrutura observada em aves criadas em piso ou em bateria. Muitos acreditam que a ave, nas primeiras horas de vida, apresente uma microbiota precária, quase inexistente (Maiorka et al., 2001). A população de *Bacteria*, visualizada através do grande número de amplicons gerados, pode ser oriunda da matriz no momento da postura do ovo, na incubadora, no nascedouro e até no momento do processamento e transporte dos pintos até o local de criação. Como os dois experimentos foram conduzidos paralelamente, somente um animal foi amostrado no momento em que as caixas com as aves recém nascidas chegaram na granja experimental. Os perfis de migração da amostra RN observado nos DGGEs (Figuras 1 e 2) são de um mesmo animal e, da mesma forma que as amostras MI, BS e LA, apresentaram um número divergente de amplicons. Essas diferenças, mesmo que mínimas, podem ser explicadas por variação na coloração dos géis em SYBR green, as quais podem interferir na sensibilidade de detecção. É importante ressaltar que essas diferenças não influenciaram a interpretação dos dados, uma vez que a análise estatística foi feita separadamente para cada condição de criação.

A análise do agrupamento hierárquico, baseados no algoritmo de Ward, possibilita identificar os efeitos dos tratamentos na estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intesinalde aves (McCracken et al., 2001).

A análise do agrupamento hierárquico gerado pelas amostras oriundas de aves criados em bateria e sobre piso mostrou que a comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos suplementados com diferentes probióticos não foi afetada pelo tipo de promotor de crescimento utilizado (Figura 4). Houve discretas modificações no ecossistema intestinal das aves submetidas a diferentes probióticos. Frangos criados em baterias e suplementados com MICRO ou LA/BS apresentaram um coeficiente máximo de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* de 0,838 e 0,897 respectivamente em relação ao CON. A similaridade máxima observada entre a estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves recebendo LEVE em relação ao controle foi de 0,750. As estruturas das comunidades de *Bacteria* do intestino das aves que receberam LEVE e foram criadas em bateria foram mais semelhantes entre si, avaliada pelo agrupamento hierárquico, apresentando um coeficiente de similaridade máximo de 0,985. Considerando-se que a microbiota intestinal dos animais que receberam levedura em bateria apresentou um número menor de amplicons do que a microbiota dos animais que receberam os demais tratamentos, e a tendência a similaridade das estruturas das comunidades de *Bacteria* do trato intestinal de frangos do grupo LEVE, pode-se inferir que a levedura modifica a microbiota intestinal de frangos criados em bateria.

A análise do agrupamento hierárquico gerado pelas amostras da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal das aves criadas sobre piso recebendo LEVE e LA/BS não possibilitou que fossem observadas grandes diferenças em comparação ao grupo CONT (Figura 5). As estruturas da comunidade de *Bacteria* de algumas aves que receberam MICRO e foram criadas em piso foi mais semelhantes dentro deste tratamento. O piso é um ambiente de, teoricamente, maior desafio e isso pode influir na capacidade do agente utilizado como promotor de crescimento. Os efeitos da levedura, neste ensaio, foram observados somente em condição de criação em baterias.

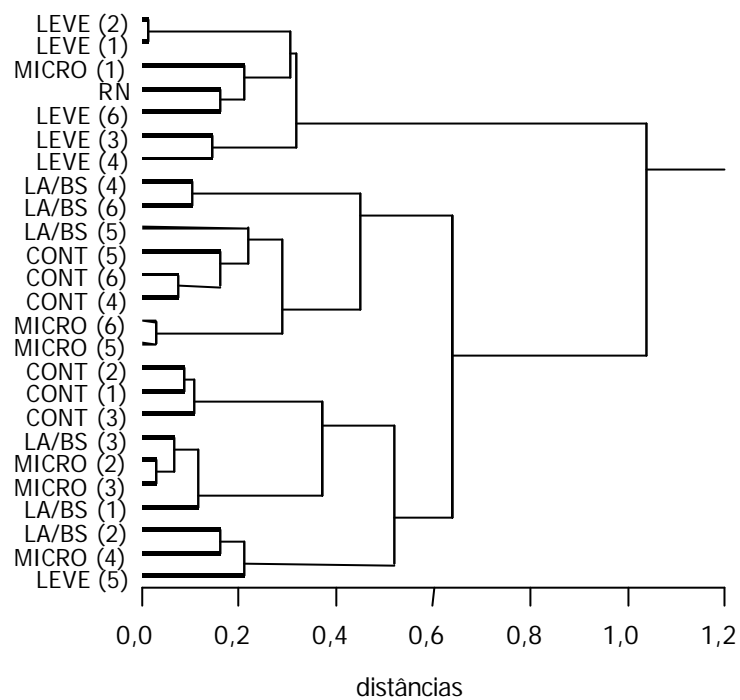


Figura 4 - Análise do agrupamento hierárquico gerado com base no perfil dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT) e o animal recém nascido (RN). Os dados referem-se ao Experimento 1. Os números entre parênteses referem-se aos indivíduos analisados.

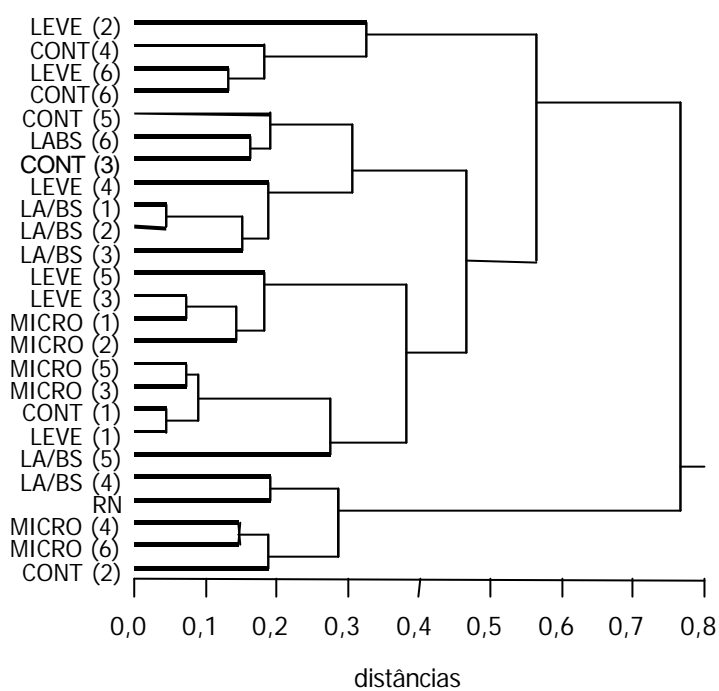


Figura 5 - Análise do agrupamento hierárquico gerado com base no perfil dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados sobre piso e suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT). Os dados referem-se ao Experimento 2. Os números entre parênteses referem-se aos indivíduos analisados.

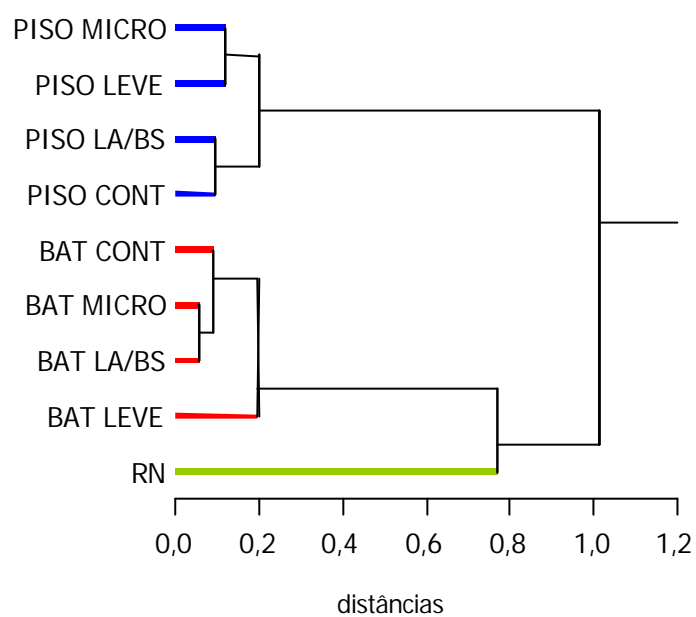


Figura 6 - Análise do agrupamento hierárquico gerado com base no perfil dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em bateria (BAT) e sobre piso (PISO) suplementados com levedura (LEVE), microbiota (MICRO), *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT) e o animal recém nascido (RN). Os dados referem-se aos Experimentos 1 e 2.

Para avaliar se existiram diferenças na microbiota proveniente de aves criadas em baterias ou sobre piso, as comunidades de bactérias de frangos criados nas duas situações foram comparadas por DGGE (Figura 6). A partir do coeficiente de similaridade obtido (Tabela 5), a estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos provenientes de um mesmo sistema de criação mas de diferentes tratamentos, foi mais similar entre si do que entre a estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino de frangos de um mesmo tratamento em condições de criações distintas. O sistema de criação foi fator decisivo para a composição da microbiota da ave. Isso é claramente visualizado pela análise de agrupamento hierárquico (Figura 6). Por essa análise, foram gerados agrupamentos distintos, em função da similaridade da estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal, entre aves criadas em baterias e entre aves criadas em piso.

Tabela 5. Coeficiente de similaridade entre as estruturas da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de frangos criados em baterias (BATERIA) e sobre piso (PISO) e suplementados com levedura viva (LEVE), microbiota liofilizada (MICRO), *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* e *Bacillus subtilis* (LA/BS), isentos de promotores de crescimento (CONT) e o animal recém nascido (RN).

		PISO				BATERIA			
		LEVE	MICRO	BS/LA	CONT	LEVE	MICRO	BS/LA	CONT
PISO	LEVE								
	MICRO	0,940							
	BS/LA	0,933	0,926						
	CONT	0,926	0,906	0,953					
BATERIA	LEVE	0,779	0,758	0,779	0,799				
	MICRO	0,839	0,805	0,839	0,859	0,940			
	BS/LA	0,852	0,819	0,852	0,859	0,926	0,973		
	CONT	0,826	0,792	0,839	0,859	0,899	0,960	0,960	
	RN	0,732	0,711	0,732	0,738	0,779	0,718	0,745	0,705

O animal recém nascido apresentou a estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino mais similar a estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino de aves criadas em bateria em relação a aves criadas em piso. Isto poderia ser devido ao fato de que a ave mantida em bateria preserva uma microbiota mais semelhante à apresentada no primeiro dia de vida, já que em bateria a exposição a microrganismos pode ser menor se comparada a exposição das aves criadas sobre piso, as quais têm contato direto com o material da cama e excretas.

5.3.2 Seqüenciamento dos amplicons do rDNA 16S

Para a análise dos amplicons de interesse (Figura 3) o DNA das bandas foi eluído do gel de poliacrilamida, reamplificado e seqüenciado diretamente. Como a análise de agrupamento demonstra haver mínimas diferenças entre as comunidades de *Bacteria*, foram selecionados apenas alguns amplicons oriundos de frangos suplementados com dietas contendo probióticos (Tabela 6). Alguns amplicons detectados através de densitometria não foram excisados manualmente, pois não foi possível sua visualização através de luz ultra violeta, em transiluminador. A análise de qualidade de seqüências geradas demonstrou que em cada banda havia uma única seqüência representando uma espécie bacteriana.

Primeiramente, foram selecionados amplicons comuns a todos os tratamentos para averiguar quais espécies são constituintes habituais da microbiota. Dois amplicons com forte intensidade são observados: A1, correspondendo a *Lactobacillus aviarius* subsp. *aviarius* e A2 representando *L. salivarius* subsp. *salivarius*. Estas duas bandas aparentemente representaram constituintes majoritários da microbiota intestinal de frangos e aparecem em todas as amostras que foram coletadas dos animais aos 21 dias de idade. O animal RN somente apresenta a seqüência correspondente a *L. salivarius* subsp

Tabela 6. Sequências parciais do rDNA 16S de *Bactéria* oriundas dos amplicons detectados por DGGE nas amostras do trato intestinal de frangos suplementados com probióticos. Amplicons comuns a todas as amostras (COMUNS), únicos (ÚNICOS) e observados nos probióticos bacterianos puros: a microbiota (MI), *Bacillus subtilis* (BS) e mistura de *Lactobacillus* (LA).

	Divisão	Subdivisão	Grupo	Subgrupo	Vizinho próximo	%	N
COMUNS	Gram positivas	Bacillus Lactobacillus Streptococcus	Lactobacillus	<i>Lactobacillus mali</i>	<i>Lactobacillus aviarius subsp. aviarius</i> ATCC 43234	82	A1
					<i>Lactobacillus salivarius subsp. salivarius</i> str. H066 ATCC 11741	53	A2
					<i>Lactobacillus animalis</i> NCDO 2425	74	A3
ÚNICOS	Gram positivas	Bacillus Lactobacillus Streptococcus	Lactobacillus	<i>Lactobacillus mali</i>	<i>Lactobacillus salivarius subsp. salicinius</i> str H0268 ATCC 11742	77	A4
	-	-	-	-	sem homologia	-	A5
MICRO	Gram positivas	Eubacterias	Clostridium coccoides	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium symbiosum</i> ATCC 14940	91	A6
				<i>xylanolyticum</i>	<i>done</i> RFP18	74	A7
				<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	76	A8
	Gram positivas com alto C+G	Streptomyces Arthrobacter	Streptomyces Actinomyces	<i>Kitasatospora setae</i>	<i>Streptomyces lavendulae</i> IFO 12340	99	A9
				<i>Cellulomonas flavigena</i>	<i>Promicromonospora citrea</i>	81	A10
				<i>Actinomyces neu</i>	<i>Actinomyces georgiae</i> DSM 6843	96	A11
BS	Gram positivas	Bacillus Lactobacillus Streptococcus	Paenibacillus polymyxa	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus sp. str. KM81</i>	77	A12
				<i>macquariensis</i>	<i>Paenibacillus campinasensis</i> str.324	72	A13
				<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	82	A14
			Staphylococcus	<i>Bacillus cereus</i>	clone DA095	47	A15
			Bacillus megaterium	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus lentus</i> JCM 2511.	38	A16
LA	Gram positivas	Bacillus Lactobacillus Streptococcus	Lactobacillus	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus lindneri</i> str. KRM DSM20690	95	A17
				<i>Lactobacillus reuterii</i>	<i>Lactobacillus oris</i> DSM 4864	93	A18
					<i>Lactobacillus fermentum</i> str. KRK	97	A19
					<i>Lactobacillus reuterii</i>	85	A20

Cs – Coeficiente de similaridade (%).

N – Número do amplicon.

salivarius, não apresentando *L. aviarius* subsp. *aviarius* como as demais amostras oriundas da microbiota de aves. Seqüência representando a espécie *L. animalis* (A3) foram observadas em todas as amostras oriundas de frangos criados em piso e somente na microbiota do animal CONT criado sobre piso. Provavelmente, a condição de um maior desafio aliado a presença de probióticos tenham suprimido a presença do microrganismo.

A espécie *L. salivarius* subsp. *salicinius* (A4) se mostrou um constituinte da microbiota intestinal de aves criadas em galpão e suplementadas com MICRO e LEVE. Outra banda foi observada somente na microbiota intestinal de frangos criados em baterias (A5), mas não foi possível encontrar seqüência homóloga a esta no banco de dados. Essa banda possivelmente representa uma nova espécie. Através da excisão e eluição de amplicons de interesse, seguido de seqüenciamento é possível afirmar que o ambiente de criação do animal foi mais importante na determinação da estrutura da comunidade de *Bacteria* do trato intestinal de aves do que o tipo de probiótico adotado, conforme os dados relativos aos DGGE já indicaram.

Somente foi possível a identificação de uma pequena parte dos microrganismos que compõem dos produtos probióticos. Para que um detalhado estudo fosse feito, seria adequada a síntese de uma biblioteca de rDNA 16S para cada um dos produtos bacterianos puros. Entretanto a técnica é extremamente onerosa e não atenderia o objetivo principal do trabalho. Optou-se por estudar apenas alguns amplicons para ter-se um panorama dos microrganismos que são utilizados como probióticos comercializados no país.

O probiótico a base de microbiota liofilizada (MI) não tem especificada em sua composição quais as espécies bacterianas presentes, só há indicação que ele foi obtido de aves saudáveis. A análise dos amplicons eluídos e seqüenciados demonstrou uma composição totalmente diferente da observada na microbiota normal de aves criadas em piso ou em bateria. Foram observadas

seqüências similares a espécie *Actinomyces georgiae*, constituinte da microbiota normal animal, não-patogênica (Jonshon et al., 1990); *Promicromonospora citrea*, microrganismo celulolítico (Bakalidou et al., 2002) e também constituinte da microbiota do trato gastrintestinal de animais (Tretýyakova et al., 1996). Foram encontradas também seqüências representando *Clostridium symbiosum* e um clone do grupo *Clostridium xylanolyticum* microrganismo relacionado a degradação de fibra por ruminantes (McSweeney, et al., 1999). Fato interessante foi a presença de *Streptomyces lavendulae*; uma bactéria filamentosa (Rintala et al., 2001) que produz peptídeos com atividade antimicrobiana (Etienne et al., 2001; Jackson et al., 2002) e *Ruminococcus gnavus*, o qual produz a substância antibacteriana chamada ruminococcina A (Dabard et al., 2001).

A capacidade de produção de compostos antibacterianos pode ser uma chave no processo de colonização e proteção de complexos ambientes (Riley, 1998). Bactérias que produzem bacteriocinas têm sido isoladas do sistema digestivo (Siracusa, 1992; Kalmokoff et al., 1999; Balla et al., 2000) e *S. lavendulae* inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *B. subtilis* *in vitro* (Taddei et al., 1998). Também *in vitro* a substância ruminococcina A foi eficaz na inibição de várias contra muitas espécies de *Clostridium* patogênicas (Dabard et al., 2001).

O probiótico MI foi desenvolvida no mercado europeu, possivelmente com aves doadoras de células criadas nas condições européias, com dietas à base de cereais de inverno, como trigo, cevada e centeio. O produto a base de microbiota de aves desenvolvido naquele mercado foi eficaz naquelas condições (Elwinger et al., 1992, Bilal et al., 2000). A dieta elaborada nesse experimento utilizou ingredientes corriqueiramente utilizados na avicultura brasileira, como milho e soja. Possivelmente, os diferentes ingredientes utilizados na composição das dietas, aliados ao ambiente de criação e manejo interfiram na composição

da microbiota do intestino determinando a eficiência do probiótico nas condições que o experimento foi conduzido.

O segundo probiótico bacteriano avaliado (BS), a base de *Bacillus subtilis*, conforme descrito na embalagem, apresentou uma vasta população de *Bacillus*. Algumas espécies de *Bacillus* são conhecidas por secretar uma variedade de enzimas extra celulares (Priest et al., 1997). Foram encontradas sequências representando as espécies *Paenibacillus* sp. str. KM81, *P. campinasensis* str. 324, *Bacillus subtilis*, um organismo do subgrupo *B. cereus* e *B. lentus*. O *B. cereus* é uma bactéria capaz de produzir esporos e somente algumas espécies produzem toxinas prejudiciais a saúde humana (Kramer et al., 1989). As espécies *B. cereus* (Tortuero et al., 1989) e *B. subtilis* (Pedroso, 1998) têm seu uso relatado como probiótico.

A bactéria *Lactobacillus* é acidificadora do trato intestinal e está relacionada com a saúde e funcionalidade do mesmo (Fuller, 1989). Muitas espécies são largamente utilizadas como probióticos para animais em diversas formulações. O probiótico PURO LA, segundo descrito pelo fabricante, continha *L. johnsonii* e *L. reuteri*. Mas apresentou uma composição mais elaborada do que o esperado. Além das sequências representando a espécie *L. reuteri*, foram encontradas sequências das espécies *L. lindneri* str. KRM, *L. oris* e *L. fermentum* str. KRK. Curiosamente não foi encontrada sequência homóloga a da espécie *L. johnsonii*. As cepas de *Lactobacillus* devem ter sido inseridas no produto durante o processo de fabricação, certamente um contaminante pertenceria outros grupos além do *Lactobacillus*. Talvez o processo de obtenção das cepas puras não tenha proporcionado a obtenção de somente os mencionados no invólucro comercial. De qualquer forma a inserção destas cepas de *Lactobacillus* não desmerece o produto, uma vez que são microrganismos não-patogênicos acidificadores do trato intestinal. A ausência de sequências representando a

espécie *L. johnsonii* pode ser devido a baixa concentração do microrganismo no produto comercial já que sua amostragem seguiu procedimentos padrões.

5.4 Conclusões

Não foram observadas alterações relevantes na comunidade bacteriana de frangos de corte criados em bateria ou sobre piso e suplementados com dietas contendo probióticos.

A estrutura da comunidade bacteriana intestinal foi modificada em função do ambiente no qual a ave foi criada.

Probióticos não tiveram a capacidade de colonizar o epitélio intestinal de frangos.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Antibióticos podem ser utilizados satisfatoriamente como promotores de crescimento para aves criadas sobre piso pois melhoram o desempenho.

Não há evidência de efeito favorável dos probióticos sobre o desempenho e incidência de oocisto na cama das aves.

Foram observadas alterações na estrutura da comunidade de *Bacteria* no intestino delgado de frangos criados em baterias e sobre piso e suplementados com antibiótico.

Foram observadas discretas mudanças na estrutura da comunidade de *Bacteria* no intestino delgado de frangos criados em baterias e sobre piso e suplementados com probióticos.

Probióticos não tiveram a capacidade de colonizar o epitélio intestinal de frangos.

A estrutura da comunidade de *Bacteria* do intestino delgado de frangos foi modificada em função do ambiente no qual as aves, suplementadas com probióticos e antibióticos, foram criadas.

Frangos isentos de promotores de crescimento apresentaram 15 unidades taxonômicas operacionais distintas na microbiota intestinal aderida ao epitélio, predominantemente *Lactobacillus* e *Pseudomonas*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v.59, n.1, p.143-169, 1995.
- APAJALAHTI, J.H.A.; KETTUNEN, A.; BEDFORD, M.R. et al. Percent G+C profiling accurately reveals diets-related differences in the gastrointestinal microbiota community of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p. 5656-5667, 2001.
- BALLA, E., DICKS, L.M., Du TOIT M. et al. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1298-1304, 2000.
- BAKALIDOU, A.; KAEMPFER, P.; MANFRED, B. et al. Cellulosimicrobium variable sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Matotermes darwiniensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, n.4, p.1185-1192, 2002.
- BEJ, A.K., MAHBUBANIA, H.M. Application of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. **PCR Methods Application**. v.1, n.1, p.151-159, 1992.
- BEJ, A.K.; MAHBUBANI, H. M.; ATLAS, R.M. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and they applications. **Critical Review Biochemistry Molecular Biology**, v.26, n.1, p.301-334, 1991.
- BIER, O. Lactobacilos. In: **Microbiologia e Imunologia**. São Paulo:Melhoramentos, 1985. 1234p.

- BITTNER, J. The clinical significance, taxonomy and special methodological problems of the pathogenic clostridia. **Infection**, v.52, n.1, p.177-122, 1980.
- BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP E.M. et al. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied and Microbiology and Biotechnology**, v.53, n., p.742-747, 2000.
- BRYANT, M.P. Introduction to gastrointestinal microbial ecology. In: MACKIE, R.I.; WHITE, B.A. **Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Ecosystems and Fermentation**. New York: Chapman & Hall., 1997. p.3-12.
- BUTOLO, J.E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1, Piracicaba, 1999. **Anais**. Piracicaba:CBNA, p.85-94.
- CAVALCANTE, J.S.; TEIXEIRA, A.S.; OLIVEIRA, .L. Probiótico e farinha de carne e ossos com diversos níveis de contaminação para frangos de corte. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, Fortaleza, 1996. **Anais**. Fortaleza:UFV, 1996. p.50-53.
- CHAPMAN, H.D., JOHNSON, Z.B. Use of antibiotics and roxarsone in broiler chickens in the USA: analysis for the years 1995 to 2000. **Poultry Science**, v.81, n.3, p.356-364, 2002.
- COATES, M.E.; COLE, C.B.; FULLER, R.; et al. The gut microflora and the uptake of glucose from the small intestine of the chick. **British Poultry Science**, v.22, p.289-294. 1981.
- COATES, M.E.; DAVIES, M.K.; KON, S.K. The effect of antibiotics on the intestine of the chick. **British Journal of Nutrition**, v.9, p.110-119, 1955.
- COATES, M.E.; FULLER, R.; HARRISON, G.F. A comparison of growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. **British Poultry Science**, v.17, p. 141-150, 1963
- COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Microingredientes: Microingredientes na Alimentação Animal. Campinas:CBNA, 1998. p.1-46.

- CROMWELL, G.L. Antimicrobial agents. In: MILLER, E.R., ULLREY, D.E., LEWIS, A.J. (Ed.). **Swine Nutrition**. Stoneham:Butterworth-Heinemann, 1991. p.297-314.
- CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; SCANIAN, C.M. et al. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with continuous characterized mixed culture of cecal bacteria. **Poultry Science**, v.74, n.8, p.916-924, 1995.
- CURY, J.C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solos de mangue contaminado com petróleo. Piracicaba, 2002. 84p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DABARD, J.; BRIDONNEAU, C.; PHILLIPE, C. et al. Ruminococcin A, a New Lantibiotic Produced by a *Ruminococcus gnavus* Strain Isolated from Human Feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.9, p.4111-4118, 2001.
- DALE, N. Probióticos para aves. **Avicultura Profissional**, v.10, n.1, p.88-89, 1992.
- DAY, C.A. Antibioticoterapia e competição exclusiva. **Boletim Informativo Aviguard**, v.2, p.21, 1996.
- DEPLANCKE, B.; HRISTOVA, K.R.; OAKLEY, H.A., et al. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.2166-2174, 2000.
- DRASAR, B.S.; BARROW, P.A. **Intestinal Microbiology**. Washington:American Society for Microbiology, 1985. 127p.
- EISSER, H.; SOMER, P. Effect of *Streptococcus faecalis* and a filterable agent on growth and nutrient absorption in gnotobiotic chicks. **Poultry Science**, v.42, n.10, p.1373-1379, 1966.
- ENBERG, R.M.; HEDEMANN, M.S.; LESER, T.D. et al. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, v.79, n.9, p.1311-1319, 2000.
- ESCHENBACH, D.A.; DAVICK, P.R.; WILLIAMS, B.L. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal Clinical Microbiology**, v.27, p.251-256, 1989.

- ETIENNE, G.; ARMAU, E.; DASSAIN, M. et al. A screening method to identify antibiotics of the aminoglycoside family. **Journal of Antibiotic**, v.44, n.12, p.1357-1366, 1991.
- FATEC. **Probiótico Calsporin**. Boletim Informativo, 1997, São Paulo, 12p.
- FELSKE, A.; AKKERMANS, A.D.L.; VOS, W.M. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p.4581-4587. 1998a.
- FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; LIS, R.V.; et al. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in drentse a grassland soils (The Netherlands). **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.871-879, 1998b.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Washington:FDA, 1988. 16p. (Compliance Policy Guide,7126.41). 1988.
- FRAGMENT ANALYSIS **User´s Guide**. Version 1.1, Molecular Dynamics. 1994. 378p.
- FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n. 1, p.131-139, 1989.
- GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v.130, p.391-395, 2000.
- GODON, J.J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P. et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small subunit rDNA sequences analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.2802-2813, 1997.
- HENRIQUE, A.P.F. Efeito de probióticos, antibióticos e ácidos orgânicos e suas combinações sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Pirassununga, 1998. 86p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
- HENRY, P.; AMMERMAN, C.B.; CAMPBELL, D.R. et al. Effect of antibiotics on tissue trace mineral concentration and intestinal tract weight of broiler chicks. **Poultry Science**, v.66, n. 8, p.1014-1018, 1987.

- HOSOYA, H.; OKAMOTO, S.; MURAMATSU, H. et al. Acquisition of certain streptomycin resistance (str) mutations enhances antibiotic production in bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.8, p.2041-2047, 1998.
- IZAT, A.L.; THOMAS, R.A.; ADAMS, M.H. Effects of dietary antibiotic treatment on yield of commercial broilers. **Poultry Science**, v.68, n.5, p.651-655, 1989.
- JACKSON M.D.; GOULD, S.J.; ZAMBRISKIE, T.M. et al. Studies on the formation and incorporation of streptolidine in the biosynthesis of the peptidyl nucleoside antibiotic streptothricin F. **Journal of Organic Chemistry**, v.67, n.9, p.2934-2941, 2002.
- JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.10, p.4200-4204, 2000.
- JONG, E.U.; LEBOUTE, E.M.; CIOCCA, M.L. et al. Uso de avoparcina e virginiamicina como promotores de crescimento em rações de frangos de corte. 1. Efeito sobre o desempenho produtivo e utilização da energia da ração. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.14, p.529-535, 1985a.
- JONG, E.U.; LEBOUTE, E.M.; CIOCCA, M.L. et al. Uso de avoparcina e virginiamicina como promotores de crescimento em rações de frangos de corte. 2. Efeito sobre a flora intestinal e estrutura física do intestino. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.14, p.536-542. 1985b.
- JOHNSON J.L., MOORE L.V.H., KANEKO B. et al. *Actinomyces georgiae* sp nov, *Actinomyces gerencseriae* sp nov, Designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A naeslundii* serotypes II and III and *Actinomyces viscosus* serotype II in *A naeslundii* genospecies 2. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.273, 1990.
- JUNQUEIRA, O.M. Enzimas sintéticas e probióticos na alimentação de aves. In: ENCONTRO DE NUTRICIONISTAS, 1, Campinas, 1994. **Anais**. Campinas:CBNA, 1994. p.13-18.

- KALMOKOFF, M. L., LU D., WHITFORD, M.F. et al. Evidence for production of a new lantibiotic (butyrvibriocin OR79A) by the ruminal anaerobe *Butyrvibrio fibrisolvens* OR79: characterization of the structural gene encoding butyrvibriocin OR79A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2128-2135, 1999.
- KANASHIRO, A.M.I., BOTTINO, J.A., FERREIRA, F et al. Influência da administração contínua de probióticos a frangos de corte sobre atividades enzimáticas, sericas e concentração de colesterol sérico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.11-17, 2001.
- KNARREBORG, A.; SIMON, M.A.; ENGBERG, R.M. et al. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.12, 2002.
- KRAMER, J.M.; GILBERT, J.M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch. 2, In: DOYLE, M.P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21-70.
- KRAUSE, D.O.; McSWEENEY, C.S.; FORSTER, R.J. Molecular ecological methods to study fibrolitic ruminal bacteria: Phylogeny, competition and persistence. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 8, Halifax, Canadá, 1999. **Proceedings**. Halifax:Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 1999. p.15-19.
- LAN, T.N.P.; HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M. et al. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by use of 16S rDNA clone libraries. **Microbiology and Immunology**, v.46, n.6, p.371-382, 2002.
- LANGENDIJK, P.S.; SCHUT, F.; JANSE, G.J. et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. With genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p.3069-3075, 1995.
- LEE, M. Molecular dynamics of the broiler intestinal tract. In: THE ELANCO GLOBAL ENTERITIS SYMPOSIUM, Cambridge, 2002. **Proceeding**. Cambridge:ELANCO, 2002, p.1-8.
- LESER, T.D.; AMENUVOR, J.Z.; JENSEN, T.K. et al. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.673-690, 2002.

- LODDI, MM.; SATO, R.N.; ARIKI, J. et al. Ação isolada ou combinada de antibiótico ou probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos de corte. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. **Anais**. Viçosa:UFV, 2000. p.48.
- LUNDEEN, T. Probiotics may alter intestinal immune function in broilers. **Feedstuffs**, v.8, n.1, p.9, 2001.
- MADEIRA, H.M.F. Uso de aditivos na alimentação de bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO – ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, Piracicaba, 1999. **Anais**. Piracicaba:FEALQ, p.51-68.
- MAGALHÃES, H.M.; BOELTER, R.; SILVA, A.R. **Elementos de farmacologia veterinária**. Porto Alegre:Sulina, 1985. 199p.
- MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M. et al. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.75-82, 2001.
- McCARTNEY, A.L.; WANG, W.; TANNOCK, G.W. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and *Lactobacillus* microflora of humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.4608-4613, 1996.
- McCRACKEN, V.J.; SIMPSON, J.M.; MACKIE, R.I. et al. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. **Nutritional Methodology**, v.131, p.1862-1870, 2001.
- McSEENEY, C.S.; DULIEN, A.; WEBB, R.I. et al. Isolation and characterization of a *Clostridium* sp with cinnamoyl esterase activity and unusual cell envelope ultrastructures. **Archivos of Microbiology**, v.172, p.139-149, 1999.
- MEDEIROS, A.A. Isolamento e caracterização de estirpes de *Lactobacillus* sp de conteúdo fecal de aves, visando seu uso como probiótico. Jaboticabal, 1998. 67p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- MONTIE, C. **Pseudomonas**. New York:Plenum, 1998. 335p.
- MOORE, L.V.H.; MOORE, L.H. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p.3202-3207, 1995.
- MOORE, W.E.; HOLDEMAN, L.V. The normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 27, p.961-979, 1974.

- MORISHITA, T.Y., AYE, P.P., HARR, B.S. et al. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of campylobacter jejuni in broilers. **Avian Diseases**, v.41, n.4, p.850-855, 1997.
- MUYZER, G. Genetic fingerprint of microbial communities – present status and future perspective. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 8., Halifax, 1999. **Proceedings**. <http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium16/muyzer.PDF> (9 Mar. 2002)
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, n.1, p.127-141, 1998.
- MUYZER, G.; WAAL, 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 rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.3, p.695-700. 1993.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Poultry**, Washington D.C.: National Academy Press, 1994. 155p.
- NETHERWOOD, T.N.; GILBERT, H.I.; PARKER, et al. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p.5134-5138, 1999.
- NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A. et al. Sequence heterogeneity of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178. p.5636-5634, 1996.
- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v.241, n.1, p.210-211, 1973.
- Nwachukwu, S.U. Bioremediation of Sterile Agricultural Soils Polluted with Crude Petroleum by Application of the Soil Bacterium, *Pseudomonas putida*, with Inorganic Nutrient Supplementations. **Currents of Microbiology**, v.42, p.231-236, 2001.
- OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.9, p.3367-3373, 1997.

- PEDROSO, A.A. Efeito de probiótico dietético sobre o desempenho, qualidade dos ovos e alguns aspectos morfológicos do trato intestinal e tecido ósseo de poedeiras. Jaboticabal, 1999. 76p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- PEDROSO, A.A.; MORAES, V.M.B.; ARIKI, J., et al. Morfometria intestinal de poedeiras alimentadas com níveis de proteína e probiótico. IN: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, Porto Alegre, 1999. **Anais**. Porto Alegre:SBZ, 1999. p.42.
- PERDIGON, G.; NADER de MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S. et al. Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**. v.70, n.8, p.919-926, 1987.
- PODSCHUN, R., PIETSCH, S.; HOLLER, C. et al. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3325-3327, 2001.
- PRIEST, F.P. Extracellular enzymes synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriology Review**, v.41, p.711-753, 1977.
- PRYDE, S.E.; RICHARDSON, A.J.; STEWARD, C.S. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen and cecal lumen of a pig. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.12, p.5372-5377, 1999.
- RASKIN, L.; CAPMAN, W.N.; SHARP, R. et al. Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. In: MACKIE, R.I., WHITE, B.A., ISAACSON, R.E. **Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Microbes and Host Interactions Ecosystems and Fermentation and Fermentation**. New York: Chapman & Hall., 1997, v.2, p.246-298.
- REILLY, K.; ATTWOOD, G.T. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strain in the rumen by competitive PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.907-913, 1998.
- RILEY, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetic**, v.32, p.255-278, 1998.
- RINTALA, H.; NEVALAINEN, N.; RONKA, E. et al. PCR primers targeting the 16S rRNA genes for the specific detection of Streptomycetes. **Molecular and Cellular Probes**, v.15, n.6, p. 337-347, 2001.

- ROSEN, G.D. Antibacterials in poultry and pig nutrition. In: WALLACE, R.J.; CHESSON, A. **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**. Canada:VCH, 1995, p.143-172.
- SALKINOJA-SALONEN, M.S.; Kähkönen, M.A.; Wittmann, C.; Peltola, R.J. Microbial activity in cold climate. In: PROSPECTIVE TERRESTRIAL ENVIRONMENT AND GROUND WATER POLLUTION RESEARCH CONFERENCE, GÖTEBORG, 1999. **Proceedings**. Göteborg:European Science Foundation & MISTRA, 1999. p. 117-125.
- SANTOS, M.S.; FERREIRA, C.L.F.; GOMES, P.C. et al. Administração de *Lactobacillus* sp em leitões nas fases de aleitamento e creche. **Ciência Agrotécnica**, v.26, n.1, p.165-173, 2002.
- SAS INSTITUTE **User's Guide Statistics** version 6.11. Cary, NC, 1998. 634p.
- SILVA, E.N.; TEIXEIRA, A.N.; BERTECHINI, A.G. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com rações contendo probióticos, antibióticos e duas fontes de fósforo. **Ciência Agrotécnica**, v.24, n.2, p.225-232,2000.
- SIMPSON, J.M.; McCracken, V.J.; WHITE, B.A. et al. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. **Journal of Microbiological Methods**, v.36, n.1, p.167-179, 1999.
- SIMPSON, J.M.; McCracken, V.J.; GASKIN, H.R. et al. Desaturating gradient gel electrophoresis analysis of ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.11, p.4705-4714, 2000.
- SIRAGUSA, G. R. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3508-3513, 1992.
- SNEL, J.; HEINEN, P.P.; BLOCK H.J. et al. Comparison of 16SrRNA sequences of segments filamentous bacteria isolated from mice, rats and chickens and proposal of *Candidatus arthromitus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.780-782, 1995.
- STERN, N.J. Mucosal competitive exclusion to diminish colonization of chicken by *Campylobacter jejuni*. **Poultry Science**, v.73, n.3, p.402-407, 1994.

- SUAU, A.; BONNET, R.; SUTREN, M. et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p.4799-4807, 1999.
- Sun X.; Griffith M.; Pasternak JJ et al. Does the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 survive cold temperature by synthesizing its own antifreeze protein? In: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD **Improving plant productivity with rhizosphere bacteria**. CSIRO:Adelaide, p.152-155. 1994
- Sun X.; Griffith M.; Pasternak JJ et al. Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.776-784, 1995.
- SYSTAT **User's Guide Statistics** version 9, Washington, DC, 1996. 1085p.
- TADDEI, A.; TREMARIAS, M.M.; CAPRILES, C.H. et al. Viability studies on actinomycetes. **Mycopathologia**, v.143, n.3, p.161-164, 1998.
- TANNOCK, G.W. Studies of intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, v.8, n.6, p.527-533. 1998.
- TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. et al. Isolates from the gastrointestinal tract, silage and yogurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.4264-4267, 1999.
- TANNOCK, G.W.; MUNRO, K.; HARMSEN, H.J.M. et al. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2578-2588, 2000.
- TOURNUT, J. Probiotics: guidelines for evaluating efficacy and objectives. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 13. Bangkok, 1994. **Proceeding**. Bangkok:ACH, 1994. p.26-30.
- TORRES, R.; RAMON, F.; de la MATA, I. et al. Enhanced production of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, n.1, p.81-84, 1999.

- TORTUERO, F.; MARTIN, L.; REJAS, J. et al. *Bacillus cereus*, virginiamicina y valor nutritivo de la cevada para los pollos. **Archivos de Zootecnia**, v.39, p.35-42, 1990.
- TRET´YAKOVA E.B.; DOBROVOL´SKAYA T.G.; BYZON, B.A. et al. Bacterial communities associated with soil invertebrates. **Microbiology New York**, v.65, n.1, p.91-97, 1996.
- VAUGHAN, E.E.; SCHUT, F.; HEILIG, H.G.H.J. et al. A molecular view of the intestinal ecosystem. **Currents Issues of Intestinal Microbiology**, v.1, p.1-12, 2000.
- WALTER, J.; TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJARVI, A. et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.297-303, 2000.
- WANG, R.; CAO, W.; CERNIGLIA, C.E. PCR detection and quantitative of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1242-1247, 1996.
- WIELEN, P.W.J.J.; BIESTERVELD, S.; NOTERMANS, S. et al. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2536-2540, 2000.
- WILLEMS, A.; FALSEN, E.; JANTZEN, E.; et al. A *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.40, n.4, p.384-398, 1990.
- YOON, J.H.; YIM, D.K.; LEE J.S. et al. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a bacterium producing cyclodextrin from starch isolated in Brazil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.833-837, 1998.
- ZHU, X.Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y. et al. 16S rRNA-Based analysis of microbiota from cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.1, p.124-137, 2002.

- ZIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4200-4204, 2000.
- ZOETENDAL, E.G.; AKKERMANS, A.D.L.; de VOS, W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.10, p.3854-3859, 1998.
- ZOETENDAL, E.G.; Von WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELA, T. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3401-3407, 2002.
- ZUANON, J.A.S.; FONSECA, J.B.; ROSTAGNO, H.S. et al. Efeito de promotores de crescimento sobre o desenvolvimento de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.4, p.999-1005, 1998.