

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MARIA CECÍLIA SOARES

**SELEÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* PARA USO COMO PROBIÓTICOS EM
EMBRIÕES**

Uberlândia

2021

MARIA CECÍLIA SOARES

**SELEÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* PARA USO COMO PROBIÓTICOS EM
EMBRIÕES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC2, GMV054).

Orientadora: Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca

Uberlândia

2021

MARIA CECÍLIA SOARES

**SELEÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* PARA USO COMO PROBIÓTICOS EM
EMBRIÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito à aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Uberlândia, 03 de novembro de 2021.

Prof^a Dr^a Belchiolina Beatriz Fonseca
Faculdade de Medicina Veterinária - UFU

Prof^a Dr^a Mônica Horr
Faculdade de Medicina Veterinária - UFU

Dr Marcelo Sebastião Rezende
Externo - BRF

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por iluminar meu caminho durante essa jornada e ter colocado pessoas de luz em minha vida.

Agradeço aos meus pais Paulo e Helena que sempre estiveram presentes e lutaram para que eu pudesse ter o melhor ensino.

Agradeço também a todos da minha família que acreditaram no meu sonho. Em especial aos meus avós Ana, José, Conceição, Salu, e Ernestina, e a meu tio Acir que já não estão mais entre nós, mas continuam a me guiar.

A minha prima Sara que me inspirou e aumentou ainda mais meu desejo em me tornar médica veterinária.

Aos meus padrinhos Edna e Cacildo por sempre torcerem por mim e me aconselharem. Aos primos Nico e a Cidinha por total apoio aos meus estudos desde a infância.

Ao meu namorado Mateus que foi fundamental me apoiando nessa reta final e me incentivando sempre a buscar o meu melhor.

A minha amiga Bárbara que sempre esteve fiel ao meu lado durante toda a graduação e mesmo longe esteve comigo.

As minhas grandes amigas Aline, Ananda, Lize e Rosinha que abriram suas casas para me receber e dividiram esse sonho comigo.

A todos os meus amigos da família D.A.C.A.W. pelo apoio integral em todos os momentos. Em especial minha amiga Andressa Brito pelos anos de amizade e por me ajudar com a formatação desse trabalho.

A turma da Rebordose, aos amigos das repúblicas Mama Cadela Vet e Balanga Teta por dividirem tantos momentos alegres.

Aos amigos de Franca da empresa Science Vet que sempre me acolheram, em especial ao prof. dr Rafael Paranhos e a José Eduardo por serem meus eternos professores.

A toda equipe do L.A.D.O.C., que de alguma forma tiraram seu tempo pra compartilhar seu conhecimento comigo, em especial minha amiga Gabriela que pacientemente me ajudou em todas as estampas desse estudo.

Agradeço a minha grande inspiração profissional, minha orientadora, Prof. Dra^a Bia Fonseca, pela amizade, ensino e dedicação, sempre me guiando para as melhores oportunidades.

Agradeço também a todos os professores que fizeram parte da minha graduação, não só pelo grande aprendizado acadêmico, mas também formação de meu caráter pessoal.

Por fim, agradeço também aos animais com que tive a oportunidade de conviver durante a vida e que com carinho despertaram em mim o amor pela medicina veterinária, em especial Lili, Brás e Tintinha, e ao meu grande companheiro de vida Leon.

RESUMO

O peso e a qualidade do embrião são dados que interferem no desempenho dos pintinhos de um dia e que podem ser influenciados pela inoculação de probióticos *in ovo* durante a fase embrionária. O presente estudo avaliou o efeito da inoculação de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* (BS) no líquido alantóide de ovos embrionados de matrizes poedeiras comerciais durante a incubação em relação ao rendimento de peso e taxa de mortalidade dos embriões. Foram utilizados 103 ovos férteis de 10 dias de vida em uma incubadora horizontal. Os ovos foram divididos em nove grupos sendo um grupo controle negativo, um grupo controle de uma cepa de BS usada no mercado e sete grupos onde foram inoculados em cada um, uma cepa de BS diferentes isoladas de diferentes origens. Os embriões foram inoculados com a mesma concentração de bactérias via líquido alantóide. Os ovos foram pesados para obtenção dos pesos absoluto e relativo ao realizar eutanásia com 17 dias. Durante o estudo foi realizada a contagem dos ovos mortos por ovoscopia diariamente e a mortalidade foi avaliada aos 17 dias de incubação para o índice de mortalidade embrionária. Dentre as cepas estudadas, apenas três apresentaram taxas insatisfatórias de mortalidade quando comparadas ao grupo controle, e a cepa G apresentou 0% de mortalidade. Ao comparar o peso dos embriões, todas as cepas se mantiveram na mesma média, exceto a cepa G que apresentou embriões mais pesados. Ao final da pesquisa, concluiu-se que a cepa G apresenta bom potencial para utilização como probiótico de embriões de galinha. Esse trabalho também mostra que o uso de embriões pode ser uma alternativa para a seleção de cepas probióticas para uso em animais.

Palavras-chave: Avicultura. Inoculação *in ovo*. Mortalidade Embrionária.

ABSTRACT

Embryonic weight and embryo quality are factors that can interfere with one-day-old chickens' performance and can be influenced by the inoculation of probiotics at the embryo stage. The present study aimed to evaluate the effects of inoculating different strains of *Bacillus subtilis*(BS) inside the air chamber of eggs descending from commercial broiler chickens over embryo weight during incubation time and embryo mortality rates. A total of 103 fertile eggs at 10-day-old of incubation were used. These eggs were sorted into different groups: one negative control group, one control group of a BS strain used in the market and seven treatment groups, each one of those were inoculated with a different BS strain. All embryos were inoculated with the same amount of bacteria through the air chamber. The embryos were weighed to obtain total and relative weight at 17 days old, right before being put through euthanasia. The embryos' deaths were evaluated in a daily through ovoscopy and at 17 days old of incubation in order to calculate the embryonic death ratio. Among the studied strains, only two presented underperforming mortality rates compared to the control group, and strain G showed a 0% mortality rate. All strains presented the same embryo weight ratios, except for strain G, which resulted in heavier embryos. The end of this research concludes that strain G presents excellent potential to be used as a probiotic for poultry embryos, requiring further studies to prove such applicability. This work also shows that the use of embryos can be an alternative for the selection of probiotic strains for use in oviparous animals.

Keywords: Aviculture. *in ovo* inoculation. Embryonic mortality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1	Uso de probióticos na avicultura	10
2.2	Inoculação <i>in ovo</i>.....	11
2.3	Utilização de <i>Bacillus subtilis</i> como probióticos	12
2.4	Probióticos para ganho de peso em embriões.....	14
2.5	Utilização de probióticos para redução de mortalidade embrionária	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Análise estatística	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÃO	21
	REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço no desempenho zootécnico dos animais de produção, o período de desenvolvimento embrionário das aves domésticas têm se tornado cada vez mais expressivo dentro do período total de criação (PROCÓPIO; LIMA, 2020). Como consequência, observa-se uma busca crescente por inovações tecnológicas que garantam maior qualidade do embrião e consequentemente intensificando o desempenho do neonato após a eclosão dos ovos (PROCÓPIO; LIMA, 2020).

Sabe-se que, mesmo antes da eclosão dos ovos, os pintainhos já possuem bactérias em seu trato digestório (MARTINS, 2019). Essa colonização precoce pode se dar de diversas formas, visto que os poros presentes na casca do ovo a tornam permeável (SOUZA, 2019). Tal colonização pode ser benéfica se envolver agentes inócuos à saúde dos pintainhos, mas também pode ser prejudicial caso ocorra a instalação de bactérias patogênicas que podem ocasionar queda de desempenho produtivo ou até mesmo o óbito nos primeiros dias de vida (MARTINS, 2019).

Durante a incubação os probióticos são considerados importantes aliados para avicultura, uma vez que são micro-organismos inócuos e que têm por finalidade evitar o crescimento dos micro-organismos patogênicos, alterando o microambiente do trato gastrointestinal das aves para favorecer a proliferação de bactérias benéficas e fazendo com que estes animais tenham melhor desempenho em decorrência de um melhor aproveitamento da dieta (LOPEZ; ISAZA; ANGEL, 2017).

O emprego dos probióticos é uma medida adotada relativamente a pouco tempo na avicultura, e pode ser utilizada tanto em animais (nos diferentes estágios de crescimento) quanto *in ovo*, por meio da inoculação destas bactérias benéficas que irão compor a microbiota intestinal dos pintainhos e inibir, por exclusão competitiva, o crescimento de organismos patogênicos, como, por exemplo, a *Salmonella* spp. (PANDOLFI; MOTA, 2021). Os principais benefícios da administração *in ovo* são o desenvolvimento da capacidade funcional digestória e a melhor absorção de nutrientes, permitindo que o neonato consiga crescer e expressar plenamente o seu potencial genético (PANDOLFI; MOTA, 2021). Desta forma, é de suma importância explorar os conhecimentos disponíveis acerca da utilização de probióticos *in ovo*, além de manter as pesquisas sobre os mesmos e também, sobre sua interferência na mortalidade e desempenho dos embriões (SOUZA, 2019). Diversos gêneros bacterianos têm seu uso como probiótico já consolidado, dentre eles, o *Bacillus* spp., incluindo diversas cepas de várias espécies do gênero. Algumas bactérias do gênero *Bacillus* são encontradas em abundante quantidade no solo, e podem contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal das aves e também para a manutenção da integridade da mucosa (VLAMAKIS et al., 2013).

Com base no panorama apresentado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação *in ovo* de diferentes cepas de *B. subtilis* (BS) no líquido alantóide durante a fase embrionária sobre o rendimento da incubação e o peso dos embriões.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uso de probióticos na avicultura

A preocupação com o aumento da resistência a antimicrobianos vem ganhando cada vez mais atenção da comunidade científica e os espaços de discussão política ao longo dos últimos anos, uma vez que as consequências desse processo, tanto para a medicina humana quanto animal, são graves (BEZERRA et al., 2017).

Na produção animal, o uso indiscriminado de antibióticos pode levar à formação de uma resistência bacteriana. Por esses animais serem destinados ao consumo humano, essas bactérias e seus genes de resistência podem ser transmitidos aos humanos e serem incorporadas à sua microbiota, causando a resistência e reduzindo assim a eficácia dos antimicrobianos (STANTON, 2013; CHANTZIARAS et al., 2014). Por esse motivo, há uma busca tanto pelo uso racional dos antibióticos quanto pela substituição desses fármacos por alternativas que não contribuam para a seleção de bactérias mais resistentes (RIBEIRO; CORTEZI; GOMES, 2018).

Como consequência dessa nova postura de diligência no emprego de antimicrobianos, surgiram diversas legislações e sanções comerciais para os setores de produção animal, incluindo a avicultura; os antibióticos, antes largamente utilizados para prevenção de doenças e como promotores de crescimento, passaram a ter seu uso proibido tanto pelos órgãos regulamentadores nacionais como também por órgãos de regulamentação internacional que interferem diretamente nas exportações do produto brasileiro (BEZERRA et al., 2017). A União Europeia foi a entidade que mais se destacou nesse sentido, estabelecendo rigorosos padrões para aceitação da carne produzida no Brasil, inclusive proibindo terminantemente a comercialização de carne de animais tratados com antimicrobianos para promoção de crescimento (LOPEZ et al., 2017). Desta forma, tanto para abastecer o mercado interno quanto o externo, tornou-se urgente o desenvolvimento de estratégias de manejo que substituam o uso desses antibióticos, fornecendo os mesmos benefícios em termos de aumento de produtividade (RIBEIRO; CORTEZI; GOMES, 2018).

Uma alternativa ao uso de antimicrobianos e promotores de crescimento na avicultura é a administração de probióticos, que contribuem para a produção de alimentos mais saudáveis e que não produzem resíduos, além de não contribuírem para o processo de resistência antimicrobiana (FREITAS; RABELO; WATANABE, 2014). Os probióticos consistem em aditivos alimentares compostos por agentes microbianos viáveis que podem ser administrados com o objetivo de colonizar o trato intestinal dos animais para gerar equilíbrio

entre as diferentes espécies já existentes na microbiota e garantir uma população capaz de promover os benefícios esperados sobre o organismo (LOPEZ; ISAZA; ANGEL, 2017). Esses agentes são inócuos à saúde do animal e também à saúde humana (LOPEZ; ISAZA; ANGEL, 2017).

As primeiras pesquisas utilizando probióticos em aves mostraram que a implementação deste tipo de aditivo na dieta de aves gerava resultados parecidos aos anteriormente observados com o uso dos antibióticos como promotores de crescimento, promovendo melhoria de desempenho dos plantéis (SOUZA, 2019).

Ainda não se sabe com certeza por quais mecanismos estes probióticos exercem seus efeitos, porém algumas teorias têm sido propostas (SOUZA, 2019). Uma destas teorias propõe que seu mecanismo de ação consiste na competição pelos sítios de ligação ou exclusão competitiva, ou seja, as bactérias probióticas vão ocupar o sítio de ligação na mucosa intestinal e assim, formar uma barreira para as bactérias patogênicas, que seriam então excluídas por competirem por espaço (LOPEZ; ISAZA; ANGEL, 2017). Essa barreira física aumentaria de forma rápida a proliferação destas bactérias, assim dificultando sua eliminação pelos movimentos peristálticos realizados pelo sistema digestório (PANDOLFI; MOTA, 2021). Outro mecanismo de ação possível dos probióticos é o aumento da imunidade, elevando os níveis de anticorpos (SOUZA, 2019). Esse estímulo do sistema imunológico está relacionado com a ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (LEEDLE, 2000).

A inoculação dos probióticos via ovo pode ser considerada uma vantagem para promover a colonização da microbiota e levar ao estabelecimento da microbiota intestinal benéfica o mais cedo possível para os pintainhos (PANDOLFI; MOTA, 2021).

2.2 Inoculação *in ovo*

Com as grandes perdas econômicas causadas pela doença de Marek na produção avícola foi desenvolvida uma nova metodologia que se demonstrou mais eficaz quando comparada com outras metodologias já existentes na época, a vacinação *in ovo* (SHARMA e BURMESTER, 1982). Atualmente essa técnica tem sido utilizada com frequência pelos incubatórios no mundo todo.

A inoculação *in ovo* consiste na introdução de uma agulha pela casca e suas membranas até atingir o líquido alantóide do ovo, disponibilizando a substância a ser inoculada no interior do embrião. O método de vacinação *in ovo* se mostrou não só uma boa técnica para vacinação, como também uma boa alternativa para a inoculação de substâncias, como os

probióticos, durante a vida embrionária. Se tornando assim uma interessante medida para proporcionar o desenvolvimento da microbiota intestinal benéfica antes mesmo da eclosão, o que resulta em uma ave menos suscetível aos desafios sanitários que poderão surgir ao longo de sua vida.

A necessidade de suplementação extra de nutrientes e outras substâncias aditivas nas aves se faz necessária para obtenção de um bom desempenho embrionário, já que as aves realizam seu desenvolvimento inicial de forma separada do organismo materno (WINJEN, et al., 2020). Portanto, o fornecimento exógeno de nutriente pela nutrição *in ovo* irá suprir a demanda do embrião, refletindo em um melhor desempenho das aves após a eclosão (GONZALEZ e JACKSON, 2020; JHA et al., 2019). Podem ser utilizadas diferentes dosagens e diferentes métodos para administração *in ovo*, variando conforme o tamanho do ovo, tipo da ave, momento e local de inoculação, sendo possível também realizar o processo de forma manual ou automática (PEEBLES, 2018). Portanto é interessante fazer o uso de nutrientes, assim como de probióticos *in ovo* (DANKOWIAKOWSKA, et al., 2019) para suprir as demandas nutricionais do embrião em desenvolvimento e proporcionar para as aves condições favoráveis para expressarem seu potencial produtivo.

2.3 Utilização de *Bacillus subtilis* como probióticos

As principais bactérias utilizadas como aditivos probióticos são as que pertencem aos gêneros *Bacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, e *Streptococcus* spp, (FREITAS; RABELO; WATANABE, 2014). Dentre os inúmeros produtos disponíveis no mercado para alimentação de diferentes espécies animais, a espécie *Bacillus subtilis* (BS) é uma comumente utilizada. A espécie é composta por bactérias Gram positivas, com formato de bastonete, facilmente encontradas na superfície do solo (VLAMAKIS et al., 2013)

As bactérias do gênero *Bacillus* spp., de maneira geral, são muito resistentes no meio ambiente; características como sua capacidade de motilidade, produção de biofilme e a resposta geral ao estresse contribuem para essa resistência (HOFFMANN; BREMER, 2011). O mecanismo principal desenvolvido especificamente pelo BS para aumentar sua sobrevivência, é a sua capacidade de realizar esporulação (VLAMAKIS et al., 2013).

Diferente das bactérias ácido lácticas, as várias espécies de *Bacillus* spp, não podem ser encontradas normalmente no trato digestório (SUN; WANG; ZHANG, 2010). No entanto, o BS transita pelo intestino juntamente com o conteúdo intestinal e sua presença dificulta, mediante a exclusão competitiva ou antagonismo, a permanência e fixação de micro-

organismos patogênicos (MARTINS, 2019). A exclusão competitiva se dá pela aderência em uma maior quantidade de sítios de ligação do intestino pela microbiota benéfica desejada, impedindo que os sítios sejam ocupados por bactérias patogênicas. Dessa maneira, a maior concentração da microbiota benéfica também faz com que esta tenha vantagem na competição por nutrientes com a bactéria indesejada (CORCIONIVOSCHL et al., 2010); Já o antagonismo direto acontece por meio da produção de ácidos orgânicos que além de acidificar o meio inibindo a multiplicação de microrganismos patogênicos, são capazes de atravessar sua membrana celular, gerando inibição do transporte de nutrientes e alteração na permeabilidade da membrana celular, fazendo com que o gasto energético do microorganismo patogênico seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. (CHOCT, 2004).

A presença do BS também diminui a produção de amônia, toxinas e aminas, contribuindo com a integridade do epitélio intestinal (AVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011). Isso pode ser explicado porque sua presença tende a influenciar o ecossistema da microbiota intestinal; capaz de reduzir a emissão de amônia em aves, melhorando a atividade enzimática e a utilização de nitrogênio (ZHANG et al., 2013).

Dessa forma, ajudam a manter o equilíbrio favorável da microbiota e modular a microbiota no trato gastrointestinal (LEE et al., 2010). Alguns estudos sugerem que o BS possui também um efeito imunestimulante (VLAMAKIS et al., 2013).

Diante de todos esses benefícios proporcionados pelo BS, estudos mais aprofundados têm sido realizados para uma maior compreensão sobre seus mecanismos. Essa espécie é uma das mais utilizadas na alimentação animal como aditivo, tornando necessárias novas tecnologias para a aplicação deste probiótico, buscando avanços na saúde e no desempenho animal em todas as fases (SILVA et al., 2021).

Os motivos da escolha de BS para testes em relação a inoculação de probióticos através do líquido alantóide de ovos embrionados e seus efeitos no desempenho na produção avícola se devem ao fato da facilidade de proliferar no intestino de animais e por serem seguros na suplementação animal. Seus mecanismos melhoram a integridade do intestino e a eficiência de absorção dos nutrientes (SILVA et al., 2021).

Portanto, a administração desses micro-organismos pode determinar uma certa proteção às aves contra a colonização por alguns patógenos, sendo de extrema importância a realização de mais estudos sobre a ação produzida por bactérias como BS e as novas tecnologias para sua administração (VLAMAKIS et al., 2013).

2.4 Probióticos para ganho de peso em embriões

Na indústria avícola, um dos pontos principais para determinar o retorno econômico é o número e também a qualidade dos pintos produzidos, tornando fundamental a qualidade do ovo fértil. Uma das características zootécnicas mais importantes a ser avaliada é o peso do ovo, isso porque o preço do ovo incubável está diretamente ligado à qualidade do pinto ao nascer (PROCÓPIO; LIMA, 2020).

A seleção do ovo por peso possui alta eficiência, devido à correlação positiva entre o peso do pinto ao nascer e o peso do ovo. Ou seja, o peso do pinto ao nascer é proporcional ao peso do ovo, representando, em média 68,3% do peso do ovo (SOUZA, 2019). Portanto, pintos nascidos de ovos pequenos foram embriões mais leves e menores quando comparados com pintos nascidos de ovos grandes (SOUZA, 2019). Vários fatores podem ser responsáveis pelo tamanho do ovo, tais como a idade do lote, a precocidade do início de produção, o manejo da alimentação e dos níveis nutricionais, consumo de água e ração e até mesmo a temperatura ambiente (MARTINS, 2019). Em 1992, foi realizado o primeiro estudo demonstrando as melhorias no ganho de peso corporal de pintainhos pelo método de inoculação *in ovo* de um conjunto de aditivos em embriões em incubação; a partir daí, vários outros experimentos comprovaram a eficácia dessa técnica (PANDOLFI; MOTA, 2021). Estudos também mostraram que pintainhos recém-eclodidos que foram alimentados *in ovo* apresentaram seu desenvolvimento funcional parecido com o de pintainhos de dois dias de idade que consumiram alimento imediatamente após a eclosão dos ovos (MARTINS, 2019). A nutrição *in ovo*, portanto, é uma técnica recente que visa melhorar o desenvolvimento do embrião e a qualidade do neonato por meio da ingestão de substâncias que antecipam o crescimento intestinal (PANDOLFI; MOTA, 2021).

2.5 Utilização de probióticos para redução de mortalidade embrionária

A inoculação de probióticos em ovos embrionados é uma maneira viável de se promover a colonização do trato gastrointestinal das aves o mais cedo possível (MARTINS, 2019). Estudos realizados em pintos de corte observaram que a inoculação de probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos *in ovo*, não prejudicou a eclosão (PANDOLFI; MOTA, 2021).

Mesmo quando o processo de inoculação *in ovo* é realizado de forma manual, aumentando o risco de ocorrência de trincas na casca e de contaminação dos ovos por bactérias, não foram observadas alterações significativas nas taxas de mortalidade embrionária; portanto, a inoculação de BS via alantóide não afeta a mortalidade embrionária (PANDOLFI; MOTA, 2021). Os efeitos positivos da alimentação *in ovo* vão além de levar a

um maior peso corporal; também pode ser observada, na eclosão uma maior taxa de eclodibilidade (SOUZA, 2019).

Acredita-se, de maneira geral, que introduzir nutrientes em ovos férteis possa estimular o desenvolvimento do embrião ainda dentro do ovo, permitindo assim a absorção desses aditivos pelo menos antes do nascimento (LOPEZ; ISAZA; ANGEL, 2017). A aplicação dessa tecnologia consegue promover um melhor status nutricional ao nascimento, proporcionando inúmeras vantagens nas primeiras horas logo após a eclosão, que é o período de maior estresse ao animal por conta da mudança de ambiente e pela constante manipulação (MARTINS, 2019). Dentre essas vantagens, destaca-se o melhor aproveitamento de nutrientes na alimentação, a queda nas taxas de mortalidade de pintinhos em decorrência de uma resposta imune mais efetiva e o aumento no desenvolvimento (SOUZA, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram incubados 103 ovos embrionados da linhagem Hy-Line W-36 de poedeiras comerciais, levados do incubatório da Granja Planalto para o incubatório da Universidade Federal de Uberlândia. Os ovos foram mantidos em uma incubadora artificial (Premium Ecológica®) na temperatura de 37,5° C (+/-0,5), com umidade de aproximadamente 55% (+/- 3%) mantida com o fornecimento de água destilada durante todo o estudo. Foi realizada a pesagem dos ovos por uma balança de precisão antes da inoculação e após a inoculação de sete diferentes cepas de BS no 10º dia de vida dos embriões. Paralelamente, um grupo inoculado com uma cepa de BS controle já utilizada no mercado (Christian Hansen) e um grupo controle negativo (inoculado com diluente) foram utilizados. O número inicial de ovos de cada grupo foi 15 ovos do grupo controle negativo, 16 inoculados com a cepa Christian Hansen, 8 com a cepa A, 16 com a cepa B, 8 com a cepa C, 8 com a cepa D, 8 com a cepa E, 16 com a cepa F e 8 ovos com a cepa G. Todos os inóculos possuíam concentração das cepas de *Bacillus* a 10³. Manualmente com seringa e agulha foram realizadas as inoculações no ovo via alantóide. Por fim, foi realizada ovoscopia diariamente com o objetivo de observar a mortalidade dos embriões após a inoculação. Foi realizada a pesagem do embrião separadamente durante a abertura dos ovos no sétimo dia após a inoculação, (17 dias de incubação). A mortalidade embrionária também foi avaliada nesse dia.

3.1 Análise estatística

A análise estatística foi realizada de forma qualitativa para o índice de mortalidade. Para o peso foi realizada a diferença de médias pelo teste T entre cada cepa testada e também para a cepa controle Christian Hansen. Foi realizada a análise através do programa Graphpad prism versão 9.0, considerando uma significância de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade dos embriões segue sistematizada conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Mortalidade diária de embriões de galinha após inoculação com BS das cepas Christian Hansen (CR), A, B, C,D, E, F e G.

Mortalidade	Controle negativo	CR	A	B	C	D	E	F	G
Nº de inoculados	15	16	8	16	8	8	8	16	8
Mortos em 24h	1	1	2	0	0	1	1	4	0
Mortos em 48h	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Mortos em 72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortos em 96h	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Mortos após 5 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortos após 6 dias	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Mortos após 7 dias	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Total de mortes	1	2	3	1	1	1	3	4	0
% mortos até 24h	6,67	6,25	25	0	0	12,5	12,5	25	0
% mortos após 24h	0	6,25	12,5	6,25	12,5	0	25	0	0

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Dos 15 ovos utilizados no trabalho como controle negativo, um (1) embrião morreu nas primeiras 24 horas (6,67%). Já entre os inoculados com a cepa Christian Hansen, bastante utilizada no mercado de probióticos, apenas dois (2) morreram, sendo um (1) nas primeiras 24 horas e outro após 48 horas do estudo, totalizando 6,25% de mortalidade em até 24 horas e 6,25% após as primeiras 24 horas. O resultado obtido com a cepa A, por sua vez, pode ser considerado negativo para o estudo, uma vez que a mortalidade de ovos inoculados para esta cepa foi de 3 ovos, sendo que destes 25% morreram nas primeiras 24 horas e 12,5% morreram após seis dias da inoculação. Já para a cepa B, do total de 16 ovos embrionados, apenas um (1) (6,25%) não sobreviveu após os 6 dias. Para a cepa C, um (1) embrião não sobreviveu às primeiras 48 horas após inoculação (12,5%) e os demais permaneceram viáveis até o final do período compreendido pelo experimento. A cepa D causou a morte de apenas um (1) embrião nas primeiras 24 horas após a inoculação (12,5%). O tratamento com a cepa E, por sua vez, resultou na morte de um (1) embrião nas primeiras 24 horas, e duas (2) outras após esse período (25%), sendo uma (1) após 96 horas e uma (1) após 7 dias. Dos embriões inoculados com a cepa F, 4 morreram nas primeiras 24 horas (25%), taxa essa, considerada alta e bastante desfavorável à aplicação desta cepa como probiótico. A cepa G, por fim,

apresentou a menor taxa de mortalidade, sendo que todos os oito (8) embriões inoculados sobreviveram até o final do experimento.

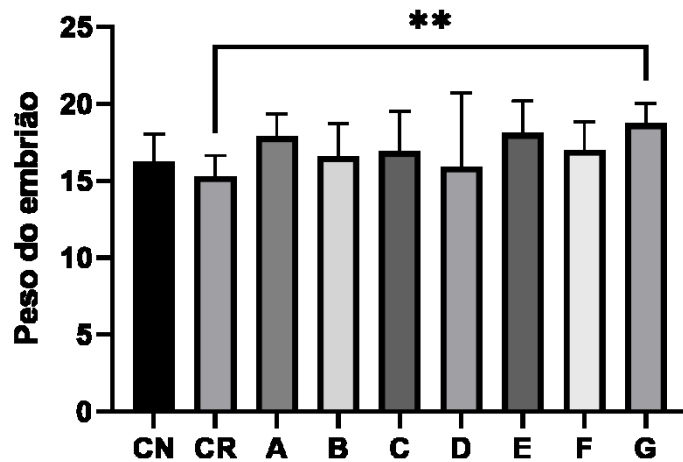
Com exceção das cepas A, E e F, que apresentaram taxas de mortalidade consideradas altas em comparação ao grupo controle, todas as demais tiveram bons resultados, com destaque para a cepa G, que teve 100% de sobrevivida. Apesar da técnica utilizada para a inoculação *in ovo* ter sido aplicada manualmente e em embriões jovens, o que aumenta o risco de aparecimento de trincas nas cascas e leva a uma ocorrência de contaminação dos ovos embrionados por bactérias (CAMPOS et al., 2011; PLANO, 2005), não observamos no estudo alterações significativas nas taxas de mortalidade embrionária. Portanto, a inoculação de BS não afetou a mortalidade embrionária.

Os resultados indicam que o processo de inoculação via líquido alantóide de fato não representou riscos à integridade dos embriões, corroborando com os resultados de Silva et al. (2021), que indicam a segurança da utilização de BS em embriões.

Os resultados também indicam que as cepas B, C, D, G tiveram bons resultados em relação a taxa de mortalidade e podem ter viabilidade de aplicação em escala industrial, especialmente considerando-se que os resultados foram semelhantes aos observados para a cepa Christian Hansen, que já é utilizada como probiótico comercial com grande aceitação de mercado. Dentre as cepas estudadas, apenas três apresentaram taxas insatisfatórias de mortalidade quando comparadas ao grupo controle, e a cepa G apresentou 0% de mortalidade.

Ao realizar as pesagens, observou-se que todas as cepas obtiveram resultados semelhantes para o peso do embrião quando comparadas com a cepa Christian Hansen, que é um probiótico já consolidado no mercado da avicultura, exceto a cepa G, para a qual se observou embriões com peso significativamente maior (Figura 1).

Figura 1. Valores médios de peso de embriões inoculados com diferentes cepas de *Bacillus subtilis*.



Fonte: Elaboração própria, 2021.

Os resultados obtidos podem ser considerados promissores, uma vez que todas as cepas mantiveram o mesmo peso de embrião que a cepa comercial Christian Hansen, cujo uso já é aprovado e também consolidado na avicultura.

A cepa G, especificamente, apresentou os resultados mais promissores, uma vez que resultou em 0% de mortalidade ao longo do experimento e que os embriões tratados obtiveram peso maior, o que é uma vantagem, como colocado por Martins (2019), considerando-se que o peso do embrião está diretamente relacionado a um desempenho superior das aves ao longo da vida. O trabalho desenvolvido por Borges (2015) apontou que a inoculação *in ovo* do BS com consequente colonização do trato intestinal das aves por este micro-organismo, além de segura, resulta em maior altura de vilosidades e profundidade de criptas do duodeno e jejuno dos animais, resultando também em maior consumo de ração, melhor conversão alimentar de frangos aos 21 dias e melhor rendimento de carcaça. Isso indica que os benefícios se mantêm ao longo de toda a vida dos animais e que este aditivo pode proporcionar considerável vantagem econômica aos produtores.

A inoculação de substâncias e aditivos probióticos via ovo pode apresentar um efeito positivo interessante sobre alguns fatores importantes, como a eclodibilidade, o desenvolvimento do trato digestivo, o peso vivo e o estado nutricional (UNI; FERKET, 2004).

Além dos efeitos diretos no uso do BS em embriões há outro ponto que deve ser discutido nesse trabalho. Os embriões tem sido usados como modelos para toxicidade e infecções (FONSECA; SILVA; MORAES-RIBEIRO, 2021) e seria interessante o uso desse modelo para seleção de cepas probióticas para outros animais da medicina veterinária e humana.

5 CONCLUSÃO

A cepa G, especialmente, parece apresentar grande potencial, tendo apresentado taxa de 0% de mortalidade e resultado em embriões de peso maior do que o observado para a cepa Christian Hansen, que é um probiótico consolidado na cadeia da avicultura e largamente utilizado.

O presente trabalho também demonstra que o uso de embriões pode ser uma interessante alternativa utilizada para selecionar cepas probióticas para utilização em animais.

REFERÊNCIAS

- AVILA, F. A.; RIGOBELLO, E. C.; MALUTA, R. P. **Antibióticos, quimioterápicos e probióticos**. Jaboticabal:FUNEP, 2011. 83p.
- BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. H.; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, R. S. C.; LOPES, E. S.; ALBUQUERQUE, A. H.; CARDOSO, W. C. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Arch. Zootec.**, v.66, n.254, p.301-307, 2017.
- BORGES, L. L. **Bacillus subtilis na qualidade dos pintinhos ao nascer, desempenho e características intestinais dos frangos**. 2015. 124f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, 2015.
- CAMPOS, A. M. A.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; SILVA, E. A.; ALBINO, L. F. T.; NOGUEIRA, E. T. Effect of in ovo inoculation of nutritious solutions on the hatchability and performance of broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.8, p.1712-1717, 2011.
- CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. **Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries**. *J Antimicrob Chemother*, v.69, p. 827-834, 2014.
- CHOCT, M. **Effects of organic acids, prebiotics and enzymes on control of necrotic enteritis and performance of broiler chickens**. University of New England Armidale, p.27-01, 2004.
- CORCIONIVOSCHI, N.; DRINCEANU, D.; POP, I.M.; STACK, D.; ŞTEF, L.; JULEAN, C.; BOURKE, B. **The effect of probiotics on animal health**. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, v.43, n.1, p.35-41, 2010.
- DANKOWIAKOWSKA, A., BOGUĆKA, J., SOBOLEWSKA, A., TAVANIELLO, S., MAIORANO, G., & BEDNARCZYK, M. Effects of in ovo injection of prebiotics and synbiotics on the productive performance and microstructural features of the superficial pectoral muscle in broiler chickens. **Poultry Science**, v.98, n.10, p.5157-5165, 2019.
- FONSECA, B.B.; SILVA, M.V.; MORAIS-RIBEIRO, L.N. The chicken embryo as an in vivo experimental model for drug testing: Advantages and limitations. **Lab Anim.**, v.50, p.138–139, 2021.
- FREITAS, E. R.; RABELLO, C. B.V.; WATANABE, P. H. Probióticos e prebióticos na nutrição de monogástricos. In: SAKOMURA, N. K. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2014, p.485-510.
- GONZALES, J. M., & JACKSON, A. R. **In ovo feeding of nicotinamide riboside affects broiler pectoralis major muscle development** 1,2. *Translation Animal Science*, v.4, n.3, 2020.
- HOFFMANN, T.; BREMER, E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.7, p.1552-1562, 2011.

- JHA, R., SINGH A. K., YADAV, S., BERROCOSO, J. F. D., & MISHRA, B. Early nutrition programming (in ovo and post-hatch feeding) as a strategy to modulate gut health of poultry. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, p.82-89, 2019.
- LEEDLE, J. **Probiotics and DFMs-mode of action in the gastrointestinal tract.**, Campinas, SP, 2000. In: Simpósio Sobre Aditivos Alternativos Na Nutrição Animal, 2000, Anais... v.1, Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.25-40, 2000.
- LEE, K.W.; LEE,S.H.; LILLEHOJ,H.S.; LI,G.X.; JANG,S.I.; BADU,U.S.; PARK, M.S.; KIM, D.K.; LILLEHOJ, E.P.; NEURNANN, A.P.; REHBERGER,T.G.; SIRAGUSA,G.R. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.203–216, 2010.
- LOPEZ, E. A. D.; ISAZA, J. A.; ANGEL, D. B. Probioticos en la avicultura: una revisión. **Revista de Medicina Veterinária**, v.35, n.1, p.1-10, 2017.
- MARTINS, L. Estrutura e função digestiva das aves: chave para a produtividade. In: III Simpósio Avícola NUTRINOVA – Saúde e Integridade Intestinal em Aves, 3, Figueira da Foz. **Anais... Figueira da Foz: NUTRINOVA**, 2019.
- PANDOLFI, J. R. C.; MOTA, S. C. A. Desenvolvimento precoce das mucosas intestinais e do status sanitário de aves por estímulos *in ovo*. **Avicultura Industrial**, v.6, p.18-24, 2021.
- PEEBLES, E. D. In ovo applications in poultry: a review. **Poultry Science**, v.97, n.7, p.2322-2338, 2018.
- PLANO, L. Embriodiagnóstico como herramienta de trabajo. *Avicultura Profesional*, v. 23, n. 1, p. 18-21, 2005.
- PROCÓPIO, D. P.; LIMA, H. J. D. Poultry production conjecture in Brazil. **Research, Society and Development**, v.9, n.3, p.33-35, 2020.
- RIBEIRO, R. C. N.; CORTEZI, A. M.; GOMES, D. E. Utilização racional de antimicrobianos na clínica veterinária. **Revista Científica UNILAGO**, v.1, n.1, p.27-40, 2018.
- SHARMA JM, BURMESTER BR. Disease control in avian species by embryonal vaccination. Patent nº 4,458,630, 1982.
- SILVA, D. A.; RABELLO, C. B. V.; SANTOS, M. J. B.; NASCIMENTO, J. C. S.; RIBEIRI, A. G.; MACAMBIRA, G. M.; OLIVEIRA, H. S. H.; SANTOS, A. C. F.; SILVA, L. A. L.; MOTA, M. A. A.; SILVA, M. F.; RODRIGUES, M. R. S.; SILVA, J. M. S. Use of microbiota balancing aditive in commercial poultry feed: review. **Research, Society and Development**, v.10, n.7, p.40-47, 2021.
- SOUZA, L. S. S. **Utilização de micro-organismos eficazes em substituição aos antibióticos promotores de crescimento na alimentação de aves.** 2019. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.
- STANTON, T.B. A call for antibiotic alternatives research. **Trends Microbiol**, v.21, p.111-113, 2013.

SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H.T. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5851–5855, 2010.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, p.101-111, 2004.

VLAMAKIS, H.; CHAI, Y.; BEAUREGARD, P.; AGUILAR, C.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Aderindo juntos: construindo um biofilme da maneira do *Bacillus subtilis*. **Nat Rev Microbiol.**, v.11, p.157-168, 2013.

WIJEN, H.J., MOLENAAR, R., van ROOVERT-REIJRINK, I. A. M., van der POL, C. W., KEMP, B., & van der BRAND, H. Effects of incubation temperature pattern on boiler performance. **Poultry Science**, v.99, n.8, p.3897-3907, 2020.

ZHANG, Z. F.; CHO, J. H.; KIM, I. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performance, immune organ relative weight, fecal gas concentration and intestinal microbial shedding in broiler chickens. **Livest. Sci.**, v.155, p.343-347, 2013.