

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

GIULIA SPIRONELLO CALCIDONI

**EFEITO DOS METABÓLITOS E DAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO GÊNERO
BACILLUS NO CONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG**

Uberlândia

2024

GIULIA SPIRONELLO CALCIDONI

**EFEITO DOS METABÓLITOS E DAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO GÊNERO
BACILLUS NO CONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Belchiolina Beatriz Fonseca

Uberlândia

2024

**EFEITO DOS METABÓLITOS E DAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO GÊNERO
BACILLUS NO CONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Medicina
Veterinária.

Uberlândia, 26 de abril de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca

Prof. Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, por me proteger e me guiar durante toda minha caminhada até aqui.

Aos meus pais, Cristiane e Fernando, que não medem esforços para me ver feliz e realizada. Sem vocês nada disso seria possível. A pessoa que sou hoje é graças a vocês, que me ensinaram a ter caráter e bom coração.

À minha família, que mesmo de longe sempre se manteve presente, torcendo e vibrando pelas minhas conquistas. Principalmente às inúmeras orações que sempre fizeram por mim.

Ao meu namorado Gabriel, que sempre impulsionou meus sonhos e me apoia em todos os meus projetos. Obrigada por ser esse companheiro incrível.

Aos meus amigos que fiz durante a graduação e que vou levar no coração por toda vida. Vocês foram minha família em Uberlândia.

À minha orientadora Bia, um exemplo de mulher e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos durante todos esses anos. À Simone, pessoa maravilhosa e a que mais me ajudou nesse projeto, obrigada por toda paciência, ajuda e orientação.

Sou grata à todos que passaram em minha vida durante esses anos e que deixaram uma marca especial de si.

RESUMO

A avicultura é um dos grandes setores do agronegócio brasileiro. A preocupação com a saúde dos animais e a qualidade de seus produtos é uma realidade no país. Diversos patógenos são responsáveis pelas enfermidades encontradas à campo e oferecem riscos à saúde pública, uma vez que podem ser transmitidos via alimentos ao homem. O maior desafio é contê-los de forma segura, sem gerar resistência aos antimicrobianos, pelo uso excessivo de antibióticos. Por esse motivo, outras alternativas como os probióticos, que são aditivos alimentares podem ser utilizados. Neste trabalho avaliamos o efeito inibitório dos probióticos *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus* e *Bacillus Licheniformis*, seus metabólitos e as vesículas extracelulares produzidas por essas cepas probióticas, quando expostos à cepa patogênica de *Salmonella* Heidelberg. Nesse estudo, as amostras foram testadas de diferentes maneiras em meio sólido e meio líquido, a fim de verificar a formação de halos inibitórios e quantificar proteínas. Os metabólitos em meio sólido não surtiram muito efeito na inibição da bactéria, já em meio líquido foram capazes de inibi-la. As vesículas de *Bacillus Licheniformis* por sua vez, tiveram um pequeno efeito sob a *Salmonella*, demonstrando que esses fragmentos probióticos podem ser explorados no controle de bactérias patogênicas.

Palavras-chave: avicultura. salmonelose.

ABSTRACT

Poultry is one of the major sectors of Brazilian agribusiness. Concern for the health of animals and the quality of their products is a reality in the country. Several pathogens are responsible for the diseases found in the field and offer risks to public health, since they can be transmitted via food to man. The biggest challenge is to count them safely, without generating resistance to antimicrobials, by excessive use of antibiotics. For this reason, other alternatives such as probiotics, which are food additives, can be used. In this work we evaluated the inhibitory effect of probiotics *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus* and *Bacillus Licheniformis*, their metabolites and extracellular vesicles produced by these probiotic strains, when exposed to the pathogenic strain of *Salmonella* Heidelberg. In this study, the samples were tested in different ways in solid medium and liquid medium in order to verify the formation of inhibitory halos and quantify proteins. The metabolites in solid medium did not have much effect on the inhibition of bacteria, but in liquid medium were able to inhibit it. The vesicula of *Bacillus Licheniformis*, in turn, had a small effect under *Salmonella*, demonstrating that these probiotic fragments can be exploited in the control of pathogenic bacteria.

Keywords: poultry. salmonellosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Avicultura no Brasil	13
2.2 Probióticos	14
2.3 <i>Bacillus</i>	15
2.4 Vesículas Extracelulares	16
2.5 <i>Salmonella</i> na avicultura	17
2.6 <i>Salmonella</i> Heidelberg	18
3 METODOLOGIA	18
3.1 Amostras	18
3.2 Efeito inibitório dos metabólitos dos <i>Bacillus</i> pela metodologia do <i>Spot</i> em meio sólio sobre a <i>Salmonella</i> Heidelberg	19
3.3 Efeito inibitório dos metabólitos dos probióticos na <i>Salmonella</i> Heidelberg em meio líquido	19
3.4 Efeito inibitório das vesículas probióticas	20
3.5 Dosagem das proteínas nas vesículas extracelulares dos <i>Bacillus</i> pelo método de Bradford	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	24

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é um dos setores que mais cresce no agronegócio brasileiro, a carne de frango é a mais exportada pelo Brasil e a produção de ovos cresce cada vez mais, sendo o país o sexto maior produtor de ovos do mundo (FAO, 2022). Por esse motivo há uma grande preocupação com a produtividade e qualidade dos alimentos de origem animal. Para tal, muito se utiliza dos melhoradores de desempenho que são empregados pela indústria na tentativa de alcançar tais objetivos, além de auxiliarem no controle de microrganismos que podem oferecer riscos à saúde animal (Schrezenmeir; De Vrese, 2001).

Esses melhoradores ou promotores de crescimento em sua maioria são à base de antibióticos. Entretanto, já há conhecimento de que o uso dessas substâncias pode trazer malefícios ao animal, como a resistência às drogas e a presença de resíduos no produto final. Por isso, outras estratégias como o uso de probióticos vem sendo utilizadas à campo (Xing *et al.*, 2015).

Probióticos são aditivos compostos por microrganismos, como bactérias e fungos (Huang *et al.*, 2004) que atuam no trato gastrointestinal das aves impedindo a atuação de microrganismos patogênicos, por diferentes mecanismos de ação (Khan; Naz, 2013). Esses probióticos podem ser formulados com bactérias de diferentes gêneros, dentre eles um gênero de relevância são os *Bacillus*, como *Bacillus Cereus*, *Bacillus Subtilis* e *Bacillus Licheniformis* (Cutting, 2011).

Ao mesmo tempo em que o setor avícola cresce, a disseminação de doenças transmitidas por alimentos também aumenta. Microrganismos patogênicos como a *Salmonella* representam risco à saúde humana e animal (Nguyen *et al.*, 2014). Essa bactéria é responsável por provocar a salmonelose, uma zoonose transmitida das aves ao homem através de sua carne ou ovos (Souza, 2015).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito dos metabólitos e das vesículas extracelulares produzidas por bactérias probióticas do gênero *Bacillus* no controle de *Salmonella* Heidelberg, importante bactéria causadora de doença alimentar em humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura no Brasil

A avicultura é um dos setores que mais tem se desenvolvido no agronegócio brasileiro. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil é o maior país exportador e o segundo maior produtor de carne de frango do mundo (ABPA, 2023). Já na produção de ovos o Brasil é o sexto maior produtor do mundo segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) (FAO, 2022). Em 2023 o país produziu 14,5 milhões de toneladas de frango e 52 bilhões de ovos (ABPA, 2023). Por esse motivo a busca pela alta produtividade, aliada à qualidade dos produtos finais, tem sido uma preocupação constante na produção intensiva de aves (Otutumi *et al.*, 2008).

No setor avícola a saúde dos animais e a qualidade de seus produtos é de suma importância. A expansão da avicultura trouxe muitos benefícios ao país, mas também contribuiu para maior disseminação de doenças transmitidas por alimentos, em especial aquelas transmitidas entre as aves e o homem. Diversos microrganismos patogênicos estão envolvidos nessas doenças, dentre eles a *Salmonella* spp. (Nguyen *et al.*, 2014). Essa bactéria é responsável pela salmonelose, uma das principais doenças transmitidas por alimentos (Who, 2016). Os produtos de origem avícola são os principais envolvidos em sua transmissão, uma vez que a *Salmonella* coloniza o trato gastrointestinal das aves (Almeida, 2015). Esses animais podem apresentar sinais clínicos da doença ou se tornarem portadores assintomáticos, os quais transmitem a bactéria ao homem, que por sua vez adquire salmonelose ingerindo principalmente carne de frango (Silva; Duarte, 2002).

O trato gastrointestinal das aves possui uma microbiota natural composta por inúmeras espécies de bactérias, protozoários e fungos que vivem em equilíbrio entre si e no organismo do hospedeiro. Esse equilíbrio é essencial ao bem-estar dos animais, pois do contrário, a presença de bactérias indesejáveis provoca danos a mucosa intestinal e prejuízos na absorção de nutrientes da ração, com consequente comprometimento no desempenho zootécnico (Loddi, 2003). Por esse motivo aditivos melhoradores de desempenho, como os antibióticos, têm sido empregados nos diferentes sistemas de produção, a fim promover a exclusão competitiva de microrganismos patogênicos, manter o equilíbrio da flora intestinal e consequentemente reduzir a mortalidade e aumentar a eficiência produtiva das aves (Salyers, 1999; Castanon, 2007).

No Brasil o uso de melhoradores de desempenho na dieta de aves é restrito. Entretanto em muitos países, o uso dessas substâncias é completamente proibido. Por esse motivo, outras

opções vêm sendo empregadas na indústria para substituí-los. Uma dessas opções são os probióticos, que produzem substâncias semelhantes aos antibióticos (Xing *et al.*, 2015) e atuam mantendo o equilíbrio da microbiota intestinal e a integridade do epitélio intestinal, além de melhorar o sistema imunológico, influenciando diretamente no desempenho animal e qualidade do produto final (Silva, 2003).

2.2 Probióticos

Probióticos são aditivos utilizados em diversos sistemas de produção animal, com o objetivo de melhorar índices zootécnicos e auxiliar no controle de microrganismos patogênicos à saúde animal. Esses produtos são suplementos alimentares compostos por microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, por meio do equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller, 1989; Kaur *et al.*; 2002). Esses microrganismos são previamente definidos e adicionados em quantidade adequada na alimentação dos animais, a fim de colonizar a microbiota do hospedeiro (Schrezenmeir; De Vrese, 2001). Além disso, devem ter a capacidade de sobreviver na microbiota intestinal e promover benefícios ao organismo (Souza, 2009).

Os probióticos possuem diversos mecanismos de ação, por meio dos quais, podem inibir o crescimento e proliferação de comunidades bacterianas indesejáveis no trato digestório do animal hospedeiro. Entre eles podemos citar a competição por sítios de adesão no epitélio intestinal ou exclusão competitiva, competição por nutrientes, produção de bacteriocinas, ácidos graxos voláteis e modulação do sistema imune (Khan; Naz; 2013).

Os microrganismos mais usados como probióticos são bactérias Gram-positivas do grupo de *Bifidobacterium* e bactérias do ácido láctico (BAL), dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Bacillus*. Além de bactérias, fungos e cepas de leveduras também podem ser utilizados (Huang *et al.*, 2004). Essas bactérias podem ser adicionadas na ração, na água de beber, ou pela pulverização nas aves ou na cama das aves e inoculação em ovos (Petri, 2000).

Essas bactérias ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal e formam uma barreira física às bactérias patogênicas, uma vez que liberam compostos como bacteriocinas (Villani *et al.*, 1995; Rodriguez, 1996; Naidu *et al.*, 1999), ácidos orgânicos voláteis (Audisio *et al.*, 2000; Jin *et al.* 2000; Ogawa *et al.*, 2001) e peróxidos de hidrogênio (Havenaar *et al.*, 1992; Naidu *et al.*, 1999) que contribuem nesse combate à bactérias patogênicas. Outros modos de ação são a exclusão competitiva que ocorre entre uma bactéria probiótica e uma patogênica, a fim de ocupar o mesmo sítio de fixação e nutrientes (Havenaar *et al.*, 1992; Ouwehand *et al.*, 1999;

Cross, 2002); a atuação sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (Kozasa, 1986); liberação de enzimas como a lactase (De Vrese *et al.*, 2001) e a produção de vesículas extracelulares que atuam como pós-bióticos (Théry *et al.*, 2018).

Esses microrgranismos são capazes de reduzir bactérias patogênicas, como cepas de *Salmonella spp.* (Palamidi *et al.*, 2016; Al-Khalaifah, 2018). Os *Bacillus* por sua vez, são muito utilizados como aditivos dietéticos em rações para animais. Na avicultura, essa cepa probiótica é empregada por sua característica favorável ao crescimento e manutenção da microbiota intestinal benéfica, capacidade de adaptação e sobrevivência à passagem pelo trato digestório das aves (Teo; Tan, 2007). Seus benefícios são observados na saúde do hospedeiro e uma de suas vantagens é que essas substâncias não deixam resíduos nos produtos de origem animal, além de não favorecerem resistência às drogas (Nepomuceno; Andreatti, 2000). Por isso podem ser bons substitutos aos promotores de crescimento antimicrobianos, funcionando como aditivos alimentares.

2.3 *Bacillus*

Os *Bacillus sp.* são um grupo de bactérias da família *Bacillaceae*, gram-positivas, em forma de bastonetes, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas com capacidade de formar esporos (Holt *et al.*, 1994; Fritze, 2004). Esses microrganismos são altamente resistentes em condições adversas presentes no meio ambiente, devido à formação desses esporos, que suportam extremos de temperatura e pH, dessecação e radiação ultravioleta (Driks, 2004; Piggot; Hilbert, 2004). Isso confere uma vantagem à essas bactérias quando utilizadas na elaboração dos probióticos (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018). Os esporos lhes permitem uma maior sobrevivência durante o trânsito estomacal (Hoa *et al.*, 2000), proporcionando sua atuação em todo o trato gastrointestinal das aves. Além disso, eles também são essenciais durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (Gil Turnes *et al.*, 1999).

Dentre as espécies de *Bacillus* mais estudadas estão *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis* (Cutting, 2011). Essas bactérias podem ser empregadas de diferentes maneiras à campo, como em rações, água de bebida, inoculação em ovos e outros. O mecanismo de ação principal é a inibição competitiva, que permite que essas bactérias benéficas multipliquem e predominem sobre populações bacterianas patogênicas (Paganini, 2000). Assim, a chance das aves se contaminarem com patógenos nocivos reduz, além de promover o ganho de peso, o controle de diarreias, reduzir o

estresse imunológico, a ocorrência de doença e a mortalidade perinatal em frangos (Richter *et al.*, 1999; Paganini, 2000).

Os *B. Subtilis*, *B. Licheniformis* e *B. Cereus* são espécies promissoras utilizadas em probióticos. O mecanismo de ação dessas bactérias envolve a síntese de substâncias antimicrobianas, aumento de imunidade inespecífica e específica, estimulação da microbiota natural do intestino e liberação de enzimas digestivas. (Leser *et al.*, 2008). Essas bactérias liberam peptídeos com atividade antimicrobiana, capazes de inibir microrganismos patogênicos (Sorokulova, 2013). Além disso, ativam macrófagos que estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez auxiliam na barreira da mucosa intestinal, contribuindo na melhora da imunidade do hospedeiro (Barnes *et al.*, 2007). Elas também estimulam o crescimento de outras bactérias benéficas no organismo, como os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e segregam enzimas digestivas para o lúmen intestinal, como amilases, lipases e proteases, que auxiliam na digestão e destroem fatores antinutricionais contidos em alimentos. (Sorokulova, 2008).

Esses probióticos possuem efeitos antimicrobianos que não causam resistência à antibióticos, além disso em sua maioria não há relatos de efeitos colaterais. Por isso, são um gênero de bactérias probióticas com alta taxa de eficácia e segurança na saúde. (Sorokulova *et al.*, 2008).

2.4 Vesículas Extracelulares

Os probióticos apresentam diversas características que os fazem ser de interesse no âmbito da saúde. Entretanto, algumas dificuldades podem inviabilizar seu uso em produtos comerciais. Por isso a busca por subprodutos como os pós-bióticos vem sendo estudadas (Varela *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Sabahi *et al.*, 2022; Srivastava; Kim, 2022). Os pós-bióticos são uma mistura de produtos metabólicos ou fragmentos inviáveis de probióticos, que possuem um efeito benéfico ao organismo animal (Thorakkattu *et al.*, 2022; Aggarwal *et al.*, 2022). Eles possuem diversas características promotoras da saúde, como a manutenção da microbiota natural, o reforço da barreira epitelial do hospedeiro, a modulação da resposta local e resposta imune sistêmica ou aumento da atividade metabólica do hospedeiro (Aggarwal *et al.*, 2022).

Dentre esses pós-bióticos, estão as vesículas extracelulares (EVs) ou vesículas de membrana (MVs), que são partículas esféricas rodeadas por uma camada bilipídica com proteínas de membrana, DNA, RNA e proteínas (Théry *et al.*, 2018); em nanoescala produzidas

por quase todos os tipos celulares vivos (Zou *et al.*, 2022). Essas EVs são responsáveis pelo transporte de diferentes macromoléculas, como lipídios, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Maccelli *et al.*, 2020; Combo *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022). Além de transportar os nutrientes, elas conseguem atravessar barreiras biológicas pelo tamanho pequeno; e também protegem o organismo contra estresses ambientais e facilitam a comunicação entre microrganismos e o hospedeiro (Combo *et al.*, 2022; Srivatsav, 2021; Huang *et al.*, 2022).

As vesículas extracelulares são um assunto de grande interesse na área da saúde. Sua estrutura e conteúdo são eficazes na promoção da saúde, além de que uma nova abordagem ao tratamento antibacteriano e antifúngico é importante, devido à questão de resistência de patógenos aos antimicrobianos (Liu *et al.*, 2018, Bose *et al.*, 2020).

2.5 *Salmonella* na avicultura

A *Salmonella* é um gênero bacteriano pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracterizada morfológicamente como um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, que não forma esporos e que se comporta como patógeno intracelular facultativo (Gasparetto, 2020; Vieira, 2019). Essa bactéria é sensível à altas temperaturas, quando aquecida a 60°C por 15 a 20 minutos e quando congelada consegue se manter em quantidade considerável, ou seja, o frio não é capaz de extingui-la completamente (D'aoust; Maurer, 2007).

O gênero *Salmonella* se divide em duas espécies, a *Salmonella bongori* com 23 sorovares e a *Salmonella enterica* com 2610 sorovares (Tindall *et al.*, 2005). A *S. enterica* por sua vez, pode ser subdividida em seis subespécies sendo a *S. enterica subsp. enterica* a de maior destaque na saúde (McLelland *et al.*, 2001). Essas subespécies podem ainda ser subdividas em sorotipos, classificados por seus antígenos de superfície conforme a classificação de Kaufmann-White: antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H) e antígenos de virulência (Vi) (Jay, 2005). Na subespécie enterica os sorogrupos mais comuns são A, B, C1, C2, D e E (Rebolledo *et al.*, 2014); os quais são responsáveis por 99% das infecções em humanos e animais. Dentre esses sorogrupos, os sorovares com maior importância na sanidade avícola e saúde pública são Typhimurium, Heidelberg, Enteritidis, Pullorum e Gallinarum, os quais podem ser separados em típicos e paratípicos.

A *Salmonella* é responsável por causar uma doença infecciosa denominada salmonelose, cuja transmissão está associada à ingestão de alimentos e água contaminados (Pinto, 2000). Essa bactéria está disseminada por todo mundo e suas características genéticas permitem que se adapte à diferentes ambientes e animais, por isso, é considerada um potencial agente causador

de zoonoses (Mendonça, 2016). Ela coloniza o trato intestinal de humanos e animais e pode ser encontrada em alimentos de origem animal, como em ovos e carne (Souza, 2015) e sua transmissão ocorre principalmente por fezes contaminadas (Shinohara *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2013).

As aves podem se contaminar nos incubatórios ou através da cama do aviário, da água e ração contaminada, do manuseio e transporte, além do contato com outros pássaros, roedores e insetos (Moraes *et al.*, 2014; Afshin *et al.*, 2014). Uma vez que a ave se infecta, seus produtos como ovos e carne, tornam-se potenciais focos de transmissão de *Salmonella* ao homem, comprometendo assim a segurança alimentar da população (Rezende *et al.*, 2005).

2.6 *Salmonella* Heidelberg

A *Salmonella* Heidelberg é um sorovar paratífico pertencente à subespécie de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Ela faz parte do sorogrupo B e tem sido isolada de aves e produtos derivados (Nascimento *et al.*, 1995). A *S. Heidelberg* é um dos principais sorovares presentes na cadeia de produtos de origem animal. Além disso, é o mais invasivo e capaz de causar infecções graves no homem se comparada à outros sorovares paratíficos (Chittick *et al.*, 2006).

A grande problemática é que além do potencial zoonótico, as cepas de *S. Heidelberg* comprometem a eficácia terapêutica dos antibióticos, o que pode ser um desafio no controle das salmoneloses (Figueiredo *et al.*, 2013). Por isso, medidas de biossegurança e de manejo devem ser elaboradas a fim de prevenir a presença dessa bactéria nas aves e nos alimentos (Mendonça, 2011).

3 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Produtos Alternativos aos Antimicrobianos (LAPAT) e Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) na Universidade Federal de Uberlândia.

3.1 Amostras

Foram utilizadas as bactérias probióticas *Bacillus Cereus* (BC), *Bacillus Licheniformis* (BL) e *Bacillus Subtilis* (BS) (IMEV®). Além disso, utilizou-se também a cepa de *Salmonella* Heidelberg, isolada de carcaças de frangos.

Os probióticos foram testados da seguinte maneira: *Bacillus Cereus* isolado, *Bacillus Licheniformis* isolado, *Bacillus Subtilis* isolado, *Bacillus Cereus* com *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus* com *Bacillus Licheniformis*, *Bacillus Licheniformis* com *Bacillus Subtilis* e um blend no qual foram misturados os três *Bacillus*. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2 Efeito inibitório dos metabólitos dos *Bacillus* pela metodologia do *Spot* em meio sólido sobre a *Salmonella* Heidelberg

Os *Bacillus* foram inoculados em 10 ml de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) a 35°C por 48 horas sob agitação. Em seguida, 3 µL do caldo foi depositado no centro de placas com Ágar Nutriente (AN) e posteriormente as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

Após, observou-se a formação dos *spots* de *Bacillus* nas placas. Em seguida foi feita a inativação desses *spots* com 1,5 ml de clorofórmio por 60 minutos, seguido de 60 minutos de exaustão para completa eliminação do vapor de clorofórmio. Após esse tempo, despejou-se 10mL de ágar AN ainda líquido contendo 10µL de *Salmonella* Heidelberg (10⁸ UFC/mL) sob as placas, e então as placas foram incubadas à 37° C por mais 24 horas.

A classificação dos halos de inibição formados foi realizada segundo a metodologia de Coelho-Rocha *et al.* (2023), na qual as atividades antibacterianas são consideradas muito fortes (diâmetro ≥ 20 mm), fortes (15 mm ≤ diâmetro ≤ 19 mm), moderadas (11 mm ≤ diâmetro ≤ 14 mm), fracas (9 mm ≤ diâmetro ≤ 10 mm) e ausente (diâmetro < 9 mm).

Foi realizado o teste t de Wilcoxon considerando uma média teórica de zero (p<0,05) usando o programa GraphPad Prism 9.2.

3.3 Efeito inibitório dos metabólitos dos probióticos na *Salmonella* Heidelberg em meio líquido

Os *Bacillus* foram incubados em 10 ml de caldo BHI a 35°C por 24 horas. No dia seguinte os tubos foram levados para a centrífuga a uma rotação de 4.500 G por 20 minutos a 4°C. Em seguida, 2 ml do sobrenadante foi misturado a 50 µL de *Salmonella* Heidelberg (10⁴ UFC/mL). O teste foi executado em triplicata com controle positivo incubados a 37°C por 24 horas.

Foi feita diluição seriada 1:10 das misturas e inoculadas posteriormente em placas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) para contagem das colônias bacterianas, incubadas a 37°C por 24 horas.

Foi realizado o teste da ANOVA seguido pelo teste de Tukey comparando cada grupo com o controle positivo considerando $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 9.2.

3.4 Efeito inibitório das vesículas probióticas

Os caldos que foram centrifugados na etapa anterior 3.3., foram filtrados com um filtro de seringa de poro 0,22 μm . O conteúdo filtrado foi levado à ultracentrífuga a 100.000 G por 2 horas a 4°C.

Após a centrifugação o sobrenadante de todas as amostras foi descartado e 100 μL de PBS foi adicionado à solução, misturados e transferidos para microtubos.

Depositou-se 20 μL de *Salmonella* Heidelberg (10^4 UFC/mL) no centro dos pocinhos da placa de 96 poços e em seguida adicionou-se 20 μL da solução com as vesículas cuidadosamente em cima da *Salmonella*. Por fim, foram adicionou-se 160 μL de caldo Mueller Hinton delicadamente. O teste foi realizado em triplicata contendo controle positivo. Essa placa foi então para a estufa a 37°C por 24 horas.

No dia seguinte foram feitas diluições em série 1:10 com as amostras dos pocinhos da placa e em seguida foi feita a inoculação em placas com XLD no método de gota. Essas placas foram para estufa a 37°C por 24 horas e posteriormente foi feita a contagem.

Como são resultados preliminares e os volumes foram idênticos para todos os meios onde as bactérias cresceram, nessa etapa a quantificação das proteínas foi realizada após a análise a fim de avaliar se quantidades similares de vesículas extraídas teriam concentrações idênticas de proteínas.

Foi realizado o teste da ANOVA seguido pelo teste de Tukey comparando cada grupo com o controle positivo considerando $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 9.2.

3.5 Dosagem das proteínas nas vesículas extracelulares dos *Bacillus* pelo método de Bradford

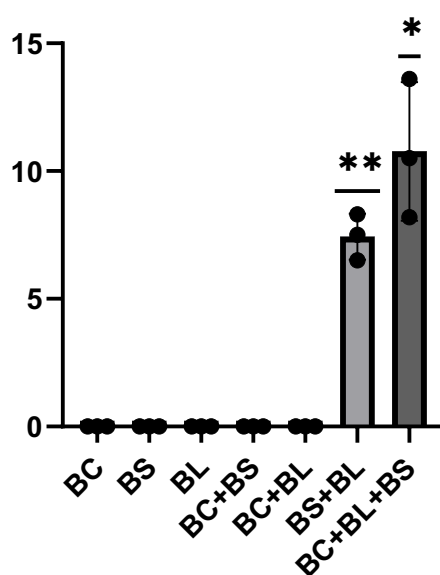
Primeiramente foi feita uma curva padrão com as seguintes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA): 0,125 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,75 $\mu\text{g/ml}$; e 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Aplicou-se 5 μL de cada amostra na placa e adicionou 195 μL do reagente Bradford. As amostras foram

incubadas sob leve agitação por 5 minutos. Depois efetuou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro.

4 RESULTADOS

Nenhuma das espécies de *Bacillus* inibiu a SH utilizando a metodologia do halo de inibição em gel. Embora o BS associado ao BL apresentasse um halo, ele foi pequeno para ser considerado significativo. A associação de todas as espécies (BL, BS e BC) apresentou moderada inibição. Porém, mesmo com inibição moderada, foi observado sinergismo entre BS e BL ou BC, bem como entre BL e BS (Figura 1).

Figura 1. Halo de inibição (mm) de *Bacillus Cereus*, *B. Subtilis* e *B. Licheniformis* em meio sólido contra *Salmonella* Heidelberg (SH)

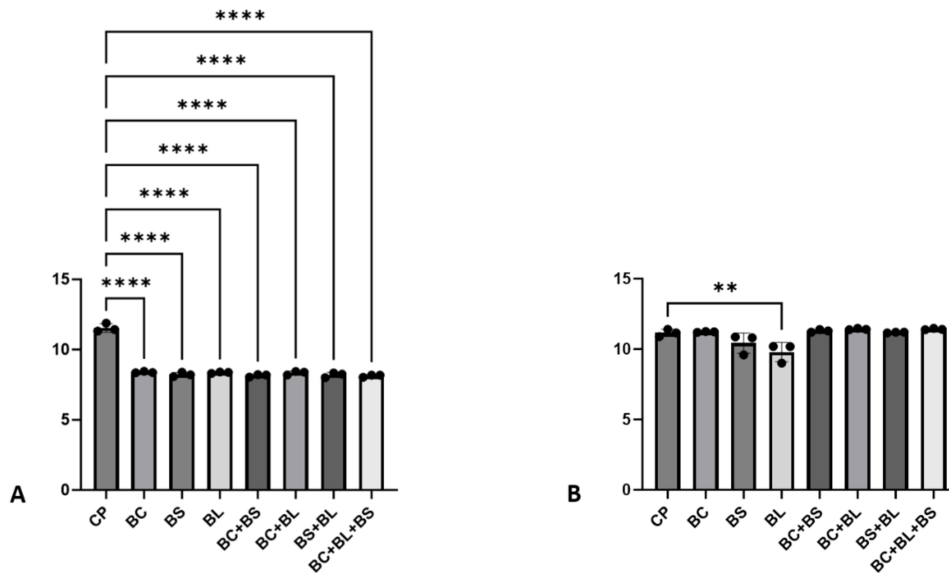


Foi realizada o teste t de Wilcoxon considerando uma média teórica de zero ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad Prism 9.2.

BC (*Bacillus cereus*), BS (*Bacillus licheniformis*) e BS (*Bacillus subtilis*). Observou-se que BC, BS e BL individualmente, assim como BC associado a BL ou BS não formaram halo de inibição. A BS associada à BL formou um halo, mas a inibição foi classificada como ausente e BC associado a BL e BS formou um halo classificado como inibição moderada (Coelho-Rocha *et al.*, 2023).

Os metabólitos reduziram a quantidade de SH em 2 logs UFC/mL em todos os tratamentos (individuais ou em blend) pela metodologia da contagem em meio líquido. As vesículas não diminuíram a quantidade de SH, exceto as vesículas produzidas por BL, que diminuíram 1 log CFU/mL (Figura 2).

Figura 2. Quantidade de *Salmonella* Heidelberg (log UFC/mL) após incubação com metabólitos (caldo sem bactérias probióticas) e com vesículas de diferentes espécies de *Bacillus* associadas ou não, por 24 horas



Testamos a ANOVA comparando cada grupo com Controle Positivo (CP) ($p < 0,05$). A: Metabólitos (caldo sem bactérias probióticas), B: Vesículas extracelulares, CP: SH não tratado, BC: *Bacillus cereus*, BS: *Bacillus licheniformis*, BS: *B. subtilis*

A análise da quantidade de proteínas pelo método de Bradford mostrou quantidades maiores para BC e a associação entre BC e BS. A quantidade do BS foi inferior a todas as demais. No entanto essa análise foi apenas descritiva.

Tabela 1. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford ($\mu\text{g/ml}$)

	BLEND	BL	BC	BS	BC + BL	BC + BS	BS + BL
Proteínas	14,52	16,1	25,9	3,64	14,16	41,46	14,64

BC= *Bacillus cereus*, BS= *Bacillus licheniformis*, BS= *Bacillus subtilis*, Blend= BC+BS+BL

5 DISCUSSÃO

Neste estudo observamos que em meio sólido, a associação de bactérias produziu halos inibitórios maiores. Isso pode ter ocorrido devido à maior produção de metabólitos pelas bactérias em associação quando comparado à produção de uma única bactéria. Korenblum *et*

al, 2005 realizou um estudo com cepas de *Bacillus* isoladas de um reservatório de petróleo brasileiro. As cepas foram capazes de inibir o crescimento bacteriano quando testadas em meio sólido e em meio líquido. Os autores observaram que o peso molecular do metabólito pode influenciar seu efeito antimicrobiano, uma vez que metabólitos com alto peso molecular formam halos inibitórios menores, fato que pode ser explicado pela alta quantidade de resíduos e outros constituintes do sobrenadantes nesses metabólitos.

No meio sólido os metabólitos de *Bacillus* não foram capazes de inibir a *Salmonella* de maneira significativa. Já no meio líquido ocorreu inibição em todos os tratamentos. Uma hipótese é que em meio sólido a difusão dos metabólitos do probiótico e bactéria patogênica ocorre em uma superfície de contato menor, enquanto que em meio líquido a superfície de contato é maior, permitindo assim maior distribuição dos metabólitos sob a *Salmonella*.

Quando as vesículas foram testadas não houve uma diminuição no número de bactérias patogênicas como ocorreu para os metabólitos. No entanto, há de se considerar que pelo baixo rendimento no processo de purificação das vesículas o teste foi realizado considerando apenas volumes idênticos de metabólitos sem considerar as quantidades das vesículas. Além disso, exploramos apenas uma concentração. Isso obviamente é um viés, porém nesse trabalho a opção foi manter e discutir as possíveis alternativas para projetos futuros.

A quantidade de proteínas quantificadas pelo método de Bradford não demonstrou relação com os resultados de inibição das EV's isoladas sob a SH, uma vez que BC e a associação entre BC e BS apresentaram maior quantidade, porém o melhor resultado foi exibido por BL. A sensibilidade insuficiente das técnicas de pesquisa pode contribuir para baixa contagem de proteínas das EVs. Da mesma forma, contaminações com proteínas derivadas de células bacterianas podem aumentar a contagem proteica e também alterar os resultados (Pedersen *et al*, 2003).

Como são secretadas por diferentes probióticos, as EVs podem desempenhar diferentes papéis a depender da cepa, do fenótipo bacteriano, das condições de cultura e dos mecanismos de biogênese pelos quais são liberadas, ou seja, não há um "mecanismo molecular universal" que condiciona as EVs dos probióticos. Por isso análises proteômicas e metabolômicas mais profundas devem ser realizadas (Bitto *et al*, 2021).

O método da ultracentrifugação utilizado neste trabalho é de difícil realização e baixo rendimento. Em trabalhos futuros sugerimos utilizar outra metodologia, como a concentração em filtros e colunas de proteínas. Krzyżek *et al*, 2023 pesquisaram em diversos artigos, as diferentes atividades biológicas das vesículas extracelulares secretadas pelos probióticos. Eles constataram que a metodologia de isolamento e purificação das vesículas extracelulares ou a

análise de suas proteínas podem influenciar nos resultados obtidos, por isso novas metodologias devem ser testadas. A maioria das EVs dos probióticos nos artigos pesquisados foram isoladas por ultracentrifugação, mas os autores sugerem outros métodos como precipitação química e cromatografia de exclusão de tamanho.

6 CONCLUSÃO

A metodologia de inibição de *S. Heidelberg* por *Bacillus* em meio líquido é mais adequada que em meio sólido. As vesículas extracelulares de *Bacillus Licheniformis* diminuem *S. Heidelberg*, mas outros trabalhos com melhor purificação das vesículas devem ser realizados para melhor entendimento da interação das vesículas extracelulares de *Bacillus* e bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). **Relatório anual 2023**. São Paulo: ABPA, 2024.
- AFSHIN J; SAEID S; REZA G. **Study on *Salmonella* contamination in poultry lean meat and meat with skin in Tabriz slaughter houses**. Afr J Biotech, 2014, 13(1): 181-184.
- AGGARWAL S.; SABHARWAL V.; KAUSHIK P.; JOSHI A.; AAYUSHI A.; SURI M. **Pós-bióticos: do conceito emergente à aplicação**. Frente. Sustentar. Sistema Alimentar, 2022.
- AL-KHALAIFAH, H.S. **Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry**. Poultry Science, v. 97, n. 11, 2018, p. 3807–3815.
- ALMEIDA, R. **Surtos por *Salmonella*: dados estatísticos, sintomas e prevenção**. Food Safety Brazil. 2015. Disponível em:< <https://foodsafetybrazil.org/surtos-por-salmonella-dados-estatisticos-sintomas-e-prevencoes/>>. Acesso em: 6 abril 2024.
- AUDISIO, M.C.; OLIVER, G.; APELLA, M.C. **Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum***. Journal of Food Protection, v.63, n.10, 2000, p.1333- 1337.
- BARNES A.G; CEROVIC V.; HOBSON P.S.; KLAVINSKIS L.S. **Esporos de *Bacillus subtilis*: Um novo adjuvante de micropartículas que pode instruir uma resposta imune Th1 e Th2 equilibrada ao antígeno específico** Eur J Immunol. 2007; 37:1538–47.
- BITTO N.J.; ZAVAN L.; JOHNSTON E.L.; STINEAR T.P.; HILL A.F.; KAPARAKIS-LIASKOS M. **Considerações para a análise de vesículas de membrana bacteriana: métodos de produção e quantificação de vesículas podem influenciar resultados biológicos e experimentais**. *Microbiol. Espectro*. 2021; 9 :e01273-21.
- BOSE S.; AGGARWAL S.; SINGH D.V.; ACHARYA N. **Vesículas extracelulares: uma plataforma emergente em bactérias gram-positivas**. *Célula Microb* 2020; 7(12):312–322.
- CASTANON, J.I.R. **History of the use of antibiotic as growth promoters in European Poultry Feeds**. Poultry Science, v.86, 2007, p.2466-2471.
- CHITTICK, P. et al. **Summary of National Reports of foodborn outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention**. Journal of Food Protection, v.69, n.5, 2006, p. 1150-1153.
- COELHO-ROCHA, N. D. et al. **Evaluation of probiotic properties of novel Brazilian *Lactiplantibacillus plantarum* strains**. Probiotics and Antimicrobial Proteins, v. 15, n. 1, 2023, p. 160-174.
- COMBO S.; MENDES S.; NIELSEN K.M.; DA SILVA G.J.; DOMINGUES S. **A descoberta do papel das vesículas da membrana externa contra bactérias**. Biomedicamentos. 2022.

CROSS, M.L. **Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, Amsterdam, v.34, n.4, 2002, p.245-253.

CUTTING, S. M. **Bacillus probiotics.** Food Microbiology, v. 28, n. 2, 2011, p. 214–220.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. **Salmonella species.** In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. (Ed). Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers. Washington: ASM Press, 2007.

DE VRESE, M. et al. **Probiotics-compensation for lactase insufficiency.** American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v.73, n.2, 2001, p.421S-429S.

DRIKS, A. **The Bacillus spore coat.** Phytopathology, v.94, n.11, 2004, p.1249-1251.

KORENBLUM, E.; VON DER WEID, I.; SANTOS A.L.S.; ROSADO, A.S.; SEBASTIÁN, G.V.; COUTINHO, C.M.L.M.; MAGALHÃES, F.C.M.; DE PAIVA, M.M.; SELDIN, L. **Produção de substâncias antimicrobianas por *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H₂O -1 e *B. licheniformis* T6-5 isolados de um reservatório de petróleo no Brasil.** Journal of Applied Microbiology, Volume 98, Edição 3, 2005, p. 667–675,

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. **Production livestock primary statistics.** Rome: FAO, 2022.

FERREIRA, L.L.; MENDES, F.R.; SANTOS, B.M.; ANDRADE, M.A.; CAFÉ, M.B. **Salmonelose em sanidade avícola e saúde pública.** Revista Eletrônica Nutritime, artigo 213, v.10, n.5, 2013, p. 2716 - 2751.

FIGUEIREDO, R. et al. **Resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella enterica* em alimentos de origem animal.** Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 108, n. 2, 2013, p.39-43.

FRITZE, D. **Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera:** The aerobic endospore-forming Bacteria. Phytopathology, v.94, n.11, 2004, p.1245-1248.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals.** Journal of Applied Bacteriology, v.66, n.5, 1989, p.365-378.

GASPARETTO, I.F. **Atividade antimicrobiana in vitro de probióticos em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri*.** 2020.

GIL-TURNES, C. et al. **Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot.** Brazilian Journal of Microbiology, v.30, n.1, 1999, p.11-14.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. **Probiotics: a genera view.** In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health an disease 1. Elsevier Applied Science, 1992, p.151-170.

HOA, N.T. et al. **Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders.** Applied and Environmental Microbiology, v.66, n.12, 2000, p.5241-5247.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994.

HUANG Y.; NIEH M.P.; CHEN W.; LEI Y. **Vesículas de Membrana Externa (OMVs) Habilitaram Bioaplicações: Uma Revisão Crítica**. Biotecnologia. Bioeng. 2022.

HUANG, M. K. et al. **Effects of lactobacilli and acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens**. Poultry Science, Champaign, v. 83, n. 5, 2004, p. 788-795.

JAY J.M.I. **Microbiologia de Alimentos**, 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005.

JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; BAIDOO, S.K. **Inhibition of enterotoxigenic Escherichia coli K88, K99 and 987P by the Lactobacillus isolates from porcine intestine**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.80, n.5, 2000, p.619-624.

KAUR, I.P. et al. **Probiotics: potential pharmaceutical applications**. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.15, 2002, p.1–9.

KHAN, R. U.; NAZ, S. **The applications of probiotics in poultry production**. World's Poultry Science Journal, v. 69, n. 3, 2013, p. 621–632.

KOZASA, M. **Toyocerin (Bacillus toyoi) as growth promotor for animal feeding**. Microbiology Aliments Nutrition, n.4, 1986, p.121-135.

KRZYŻEK P.; MARINACCI B.; VITALE I.; GRANDE R. **Extracellular Vesicles of Probiotics: Shedding Light on the Biological Activity and Future Applications**. Pharmaceutics. 2023; 15(2):522.

LESER T. D.; KNARREBORG A.; WORM J. **Germinação e crescimento de esporos de Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis no trato gastrointestinal de porcos**. J. Appl Microbiol. 2008;104:1025–33.

LIU H.; ZHANG Q.; WANG S.; WENG W.; JING Y.; SU J. **Vesículas extracelulares bacterianas como nanocarreadores bioativos para administração de medicamentos: avanços e perspectivas**. Bioato. Matéria. 2022

LIU Y.; DEFOURNY K.A.Y.; SMID E.J.; ABEE T. **Vesículas extracelulares bacterianas Gram-positivas e seu impacto na saúde e na doença**. Microbiol Frontal. 2018, 9:1502.

LODDI, M.M. **Probióticos, prebióticos e acidi cantes orgânicos em dietas para frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

MACCELLI A.; CARRADORI S.; PUCA V.; SISTO F.; LANUTI P.; CRESTONI M.E.; LASALVIA A.; MURARO R.; BYSELL H.; SOTTO A.D.; et al. **Correlação entre a atividade antimicrobiana e os perfis metabólicos de sobrenadantes livres de células e vesículas de membrana produzidas por Lactobacillus reuteri DSM 17938**. Microrganismos. 2020.

MCLELLAND, M.; SANDERSON, K.E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; DOM, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R.K. **Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2**. Letters to Nature [online], v.413, 2001, p.852–856.

MENDONÇA, E. P. **Disseminação de Salmonella sp. na cadeia produtiva do frango de corte**. 70f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

MENDONÇA, E.P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de Salmonella com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. 131f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, Uberlândia/MG.

MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. **Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production**. Journal of Applied Microbiology, v. 124, n. 6, 2018, p. 1334–1346.

MORAES D.M.C.; ANDRADE M.A.; MINAFRA-REZENDE C.S.; BARNABÉ A.C.; DE SÁ JAYME V.; NUNES I.A.; BATISTA D.A. **Fontes de infecção e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de Salmonella sp. isoladas no fluxo de produção de frangos de corte**. Arq Inst Biol. 2014; 81(3): 195-201.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. **Probiotic spectr of lactic acid bacteria (LAB)**. Critical Reviews in Food Scienc and Nutrition, v.38, n.1, 1999, p.13-126.

NASCIMENTO, V. P. **Salmoneloses aviárias: uma revisão**. In: Simpósio de produção de matrizes de corte,1. Anais, Chapecó, 1995, p. 51-61.

NEPOMUCENO, E.S.; ANDREATTI, R.L.F. **Probióticos e prebióticos na avicultura**. EMBRAPA Suínos e Aves, v.1, 2000, p.45-55.

NGUYEN, H. D. N.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. **Biofilm formation of Salmonella Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level**. LWT – Food Science and Technology, v.55, n.1, 2014, p.383-388.

OGAWA, M. et al. **Inhibition of in vitro growth of Shiga toxinproducin Escherichia coli O157:H7 by probiotic Lactobacillu strains due to production of lactic acid**. International Journal of Food Microbiology, v.68, n.1-2, 2001, p.135-140.

OTUTUMI, L.K.; FURLAN, A.C.; NATALI, M.R.M.; MARTINS, E.N.M.; LODDI, M.M.; OLIVEIRA, A.F.G. **Utilização de probiótico em rações com diferentes níveis de proteína sobre o comprimento e a morfometria do intestino delgado de codornas de corte**. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v.30, n.3, 2008, p.283-289.

OUWEHAND, A.C. et al. **Probiotics: mechanisms and established effects**. International Dairy Journal, Amsterdam, v.9, n.1, 1999, p.43- 52.

PAGANINI, F. J. **Inibição competitiva no ambiente de produção de frangos**. 2000.

PALAMIDI, I. et al. **Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers**. *Poultry Science*, v. 95, n. 7, 2016, p. 1598–1608.

PEDERSEN S.K.; HARRY J.L.; SEBASTIAN L.; BAKER J.; TRAINI M.D.; MCCARTHY J.T.; MANOHARAN A.; WILKINS M.R.; GOOLEY A.A.; RIGHETTI P.G., et al. **Proteoma invisível: mineração abaixo da ponta do iceberg para encontrar proteínas de membrana e baixa abundância**. *J. Proteoma Res.* 2003; 2 :303–311.

PETRI, R. **Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil**. Anais. Santa Maria: UFSM, LCDPA, EMBRAPA, 2000, p. 41-44.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. **Sporulation in *Bacillus subtilis***. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, 2004, p.1-8.

PINTO, P. S. A. **Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose**. *Revista Higiene Alimentar*, v. 14, n. 73, 2000, p. 39-43.

REBOLLEDO, J. et al. **International outbreak investigation of *Salmonella Heidelberg* associated with in-flight catering**. *Epidemiology and Infection*, v. 142, n. 4, 2014, p. 833–842.

REZENDE, C.S.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; LINHARES, G.F.C.; MESQUITA, A.Q.; MINAFRA, C.S. **Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos**. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.100, 2005, p.199-203.

RICHTER, G.; KÜHNE, I.; KÖHLER, H. **Test of Toyocerin in broiler fattening**. In: *Symposium Vitamins and Additives in Nutrition of Man and Animal 7*. 1999, p.52-53.

RODRIGUEZ, J.M. **Antimicrobial spectrum, structure, propertie and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcu lactis***. *Food Science and Technology International*, v.2, n.2, 1996, p.61-68.

SABAHI S.; HOMAYOUNI RAD A.; AGHEBATI-MALEKI L.; SANGTARASH N.; OZMA M.A.; KARIMI A.; HOSSEINI H.; ABBASI A. **Pós-bióticos como a nova fronteira na pesquisa alimentar e farmacêutica**. *Crítico. Rev. Nutr.* 2022.

SALYERS, A.A. **Agricultural use of antibiotics and antibioticresistance in human pathogens: is there a link?** Nottingham: Alltech, 1999. p.155-171.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. **Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition**. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, 2001, p.361S-364S.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; FILHO, J.L. ***Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos**. *Ciência Saúde Coletiva*, v.13, n.5, 2008.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. **Salmonella Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil.** Revista Brasileira de Ciências Avícolas, v.4, n.2, 2002, p.85-100.

SILVA, L.P.; NORBERG, J.L. **Prebióticos na nutrição de não ruminantes.** Ciência Rural, v.33, n.5, 2003, p.983-990.

SOROKULOVA I. **Status moderno e perspectivas das bactérias Bacillus como probióticos.** J. Prob Health. 2013, 1:4.

SOROKULOVA I. **Testes pré-clínicos no desenvolvimento de probióticos: Uma perspectiva regulatória com cepas de Bacillus como exemplo** Clin Infect Dis. 2008, 46(Suplemento 2):S92–5.

SOROKULOVA I.B.; PINCHUK I.V.; DENAYROLLES M.; OSIPOVA I.G.; HUANG J.M.; CUTTING S.M., et al. **A segurança de duas cepas probióticas de Bacillus para uso humano.** Dig Dis Sci. 2008; 53:954–63

SOUZA, E.; WERTHER, K.; BERCHIERI JÚNIOR, A. **Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens and Salmonella spp. in wild birds captured near poultry facilities.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 62, n.1, 2015, p.219-223.

SOUZA, G. M. **Os promotores de crescimento na produção de aves de corte.** Campo Grande, Mato Grosso do Sul: Universidade Católica Dom Bosco, 2009.

SRIVASTAVA P., KIM K. **Vesículas de membrana derivadas da microbiota intestinal e probióticos: abordagens terapêuticas de ponta para superbactérias multirresistentes ligadas a anomalias neurológicas.** Farmacêutica. 2022.

SRIVATSAV A.T.; KAPOOR S. **O mundo emergente das vesículas de membrana: relevância funcional, caminhos teranósticos e ferramentas para investigar a função da membrana.** Frente. Mol. Biosci. 2021.

TEO, A. Y.; TAN, H.M. **Evaluation of the Performance and Intestinal Gut Microflora of Broilers Fed on Corn-Soy Diets Supplemented With Bacillus subtilis PB6 (CloSTAT).** Journal of Applied Poultry Research, v. 16, n. 3, 2007, p. 296–303.

THÉRY, C.; WITWER, K.W.; AIKAWA, E.; ALCARAZ, M.J.; ANDERSON, J.D.; ANDRIANTSITOHAINA, R., et al. **Informações mínimas para estudos de vesículas extracelulares 2018 (MISEV2018): uma declaração de posição da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares e atualização das diretrizes MISEV2014.** J. Extracell. Vesículas. 2018, 7:1535750.

THORAKKATTU P.; KHANASHYAM A.C.; SHAH K.; BABU K.S.; MUNDANAT A.S.; DELIEPHAN A.; DEOKAR G.S.; SANTIVARANGKNA C.; NIRMAL N.P. **Pós-bióticos: Tendências Atuais na Indústria Alimentar e Farmacêutica.** Alimentos. 2022.

TINDALL, B. J. et al. **Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, n. 1, 2005, p. 521–524.

VARELA-TRINIDAD G.U.; DOMÍNGUEZ-DÍAZ C.; SOLÓRZANO-CASTANEDO K.; ÍÑIGUEZ-GUTIÉRREZ L.; HERNÁNDEZ-FLORES T.D.J.; FAFUTIS-MORRIS M. **Probióticos: protegendo nossa saúde do intestino**. Microorganismos. 2022.

VIEIRA, K.A.R. **Salmonella spp na cadeia produtiva de frangos de corte**. 2019. 44f. Trabalho de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, Rio Verde/GO.

VILLANI, F. et al. **Antilisterial activity of thermophilin 347, bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus**. International Journal of Food Microbiology, v.25, n.2, 1995, p.179-190.

WANG G.; CHEN Y.; XIA Y.; SONG X.; AI L. **Características das preparações probióticas e suas aplicações**. Alimentos. 2022.

WHO– WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella (non-typhoidal)**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>>. Acesso em: 6 abril 2024.

XING, Y. et al. **Effects of dietary supplementation with lysine-yielding Bacillus subtilis on gut morphology, cecal microflora, and intestinal immune response of Linwu ducks**. Journal of Animal Science, v. 93, n. 7, 2015, p. 3449–3457.

ZOU C.; ZHANG Y.; LIU H.; WU Y.; ZHOU X. **Vesículas extracelulares: insights recentes sobre a interação entre hospedeiro e bactérias patogênicas**. Frente. Imunol. 2022.