

## EFEITO DA INOCULAÇÃO IN OVO DE PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA DE PINTOS DE CORTE

FABYOLA B. CARVALHO<sup>1</sup>, HIGOR S. V. SANTOS<sup>1</sup>, JOSÉ H STRINGHINI<sup>1</sup>, MARCOS B. CAFÉ<sup>1</sup>, NADJA S.M. LEANDRO, ALESSANDRA G MASCARENHAS<sup>1</sup>, JOSILENE C. ROCHA<sup>1</sup>, JULIA M. S. SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/Goiás – Brasil.  
Contato: fabyola\_carvalho@ufg.br / Apresentador: FABYOLA B CARVALHO

**Resumo:** Objetivou-se avaliar os efeitos dos probióticos nos parâmetros de incubação e na composição da microbiota de neonatos. Utilizou-se 360 ovos férteis em delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos de inoculação in ovo, sendo tratamento placebo e dois tratamentos com inoculação de probióticos (cultura indefinida e cepas múltiplas definidas). A solução injetável teve proporção de 1:40, com volume de 0,2 mL/ovo, inoculado no líquido amniótico aos 18,5 dias de incubação. Os parâmetros de incubação não foram afetados pela inoculação. A composição bacteriana a nível de filo e espécie da microbiota dos pintos neonatos que receberam inoculação de placebo foram Proteobacteria 85,97% e *Novosphingobium capsulatum* 48,14%, respectivamente. Para os pintos inoculados com probiótico de cultura indefinida encontrou-se também Proteobacteria 96,71%, e para espécie, espécies desconhecidas e outras espécies 68,57%. Os pintos neonatos que receberam cepas múltiplas definidas apresentaram os filos mais abundantes de Proteobacteria 93,97%, e para espécie a *Novosphingobium capsulatum* 47,59%. Como conclusão a metodologia de inoculação de probióticos in ovo não interfere nos parâmetros de incubação. Os probióticos empregados neste estudo não modularam a microbiota dos neonatos.

**PalavrasChaves:** avicultura, incubação, microbiota, vilosidades

## EFFECT OF IN OVO INOCULATION OF PROBIOTICS ON THE MICROBIOTA OF BROILER CHICKS

**Abstract:** The objective was to evaluate the effects of probiotics on incubation parameters and the composition of the microbiota of neonates. The study had 360 fertile eggs a completely randomized experimental design with three in ovo inoculation treatments: a placebo treatment and two probiotic inoculation treatments (indefinite culture and defined strains). The diluent was injected a ration of 1:40 in a volume of 0.2 mL/egg; inoculation into the amniotic fluid occurred at 18.5 days of incubation. Incubation parameters were not affected by inoculation. As for the composition of the intestinal microbiota, the highest relative abundances were found for the phylum, Proteobacteria 85.97% and Species, *Novosphingobium capsulatum* 48.14%. For chicks inoculated with undefined culture, the highest relative abundances for phylum, Proteobacteria 96.71% and Species, species were unknown species and other species 68.57%. For chicks inoculated with multiple defined strains, the highest relative abundances for phylum, Proteobacteria 93.97% and Species, *Novosphingobium capsulatum* 47.59%. In conclusion, the in ovo probiotic inoculation methodology does not interfere with the incubation parameters. However, probiotics, regardless of the inoculated composition, not modulate the microbiota of neonates.

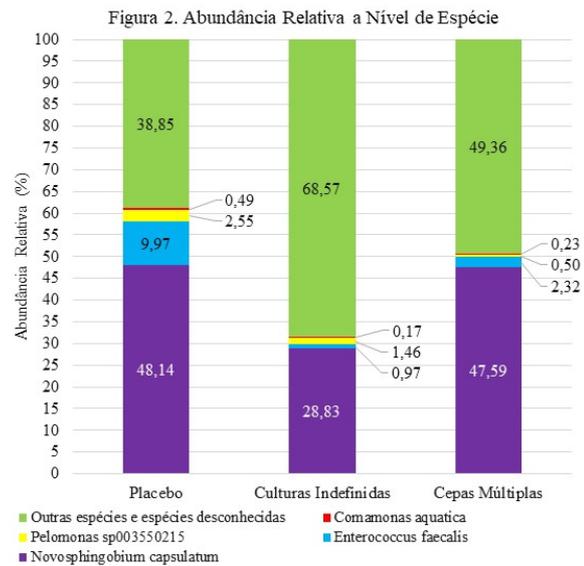
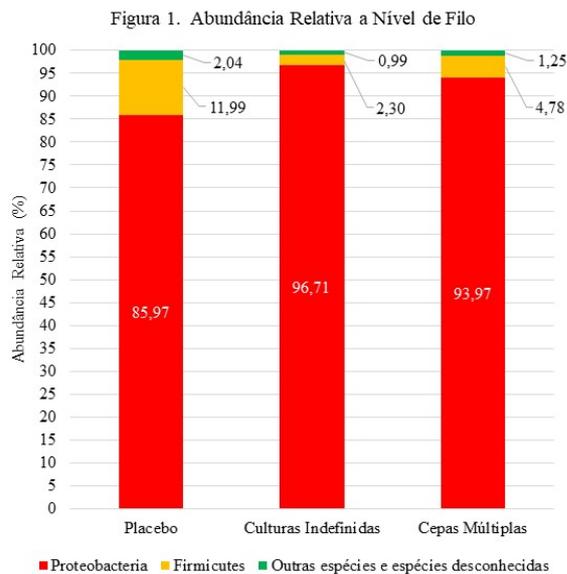
**Keywords:** poultry farming, incubation, microbiota, villi.

**Introdução:** A microbiota presente no trato gastrointestinal dos pintos neonatos é imatura e pouco diversificada, maior parte oriunda da transmissão vertical através do trato reprodutor da matriz, mas pode ocorrer após a oviposição onde os ovos têm contato direto com o ninho ou nascedouro<sup>7</sup>. Embora o período de desenvolvimento da microbiota das aves se inicia entre 2 a 4 dias de idade<sup>1</sup>, há registros de formação da microbiota estruturada após a eclosão pela inoculação de probióticos na terceira semana de incubação<sup>5</sup>. A inoculação de probióticos favorece aos pintos neonatos uma microbiota estruturada, apresentando em sua composição grupos taxonômicos relacionados a microrganismos benéficos como pertencente ao filo Firmicutes<sup>5</sup>, que atuam na exclusão competitiva através da eliminação de bactérias patogênicas pela produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas<sup>6</sup>. Objetivou-se avaliar os efeitos dos probióticos nos parâmetros de incubação e na composição da microbiota de neonatos.

**Material e Métodos:** Foram utilizados 360 ovos férteis oriundos de matrizes da linhagem Ross com 32 semanas de idade. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos de inoculação in ovo, sendo tratamento placebo (inoculação de solução salina estéril) e dois tratamentos com inoculação de probióticos (cultura indefinida e cepas múltiplas definidas) com 120 ovos cada. A preparação da solução injetável seguiu a recomendação do fornecedor sendo 0,005 mL de probiótico e 0,195 mL de solução salina, totalizando inoculação única de 0,2 mL/ovo. A inoculação se deu via cavidade amniótica no ovo com 18,5 dias de incubação (444 horas)<sup>2</sup>. Ao final do nascimento foi calculada a eclodibilidade e realizou-se o embriodiagnóstico dos ovos não eclodidos<sup>2</sup>. Todos os neonatos foram pesados para avaliação do peso inicial, e destes, 15 pintos por tratamento foram separados para a avaliação da qualidade física de pintos. Ao final, cinco pintos por tratamento foram eutanasiados por deslocamento cervical para a pesagem do resíduo vitelino e intestino total. Mais 15 pintos foram utilizados para coleta do pool de mecônio e conteúdo cecal. Para a coleta do mecônio, o microtubo de centrifugação foi posicionado na saída da cloaca e exerceu-se leve pressão no abdômen do pinto. Posteriormente, foi realizada a eutanásia e o restante do conteúdo cecal também foi armazenado no mesmo microtubo. As análises da microbiota foram realizadas no laboratório Imunova.

**Resultado e Discussão:** Os resultados de eclodibilidade por tratamento foram placebo 92,85%, cultura indefinida 85,71% e cepas múltiplas definidas 87,50%, sem diferença estatística, o que está de acordo com resultados encontrados na literatura<sup>8</sup>. Os resultados do embriodiagnóstico também não diferiram (dados não apresentados). Pintos oriundos dos ovos inoculados

com placebo obtiveram menor escore de pernas e dedos, entendendo-se que apresentaram maior dificuldade em eclodir dos ovos. Observou-se que os pintos que receberam probióticos in ovo obtiveram maior relação entre o peso do intestino e o peso do pinto sem gema em comparação ao tratamento placebo (dados não apresentados). O intestino fica mais pesado quando os probióticos são suplementados na ração<sup>4</sup>. Os trabalhos tem encontrado maiores valores do filo Firmicutes 79,88%<sup>3</sup>, 98,00%<sup>8</sup> quando inoculado apenas *Bacillus subtilis* in ovo. Neste experimento, para todos os tratamentos, encontrou-se menor percentual de filo Firmicutes e maior abundância do filo Proteobacteria (Figura 1). A menor abundância relativa do filo Firmicutes resultou em baixo percentual de bactérias oriundas deste filo, apresentado apenas a espécie *Enterococcus faecalis* em 9,97% para o tratamento placebo; 2,32% para o tratamento de cepas múltiplas definidas e 0,97% para o tratamento de cultura indefinida. (Figura 2). No experimento atual, a coleta do conteúdo intestinal foi ao finalizar a incubação, isso reforça que talvez não permitiu a tempo o desenvolvimento ou a colonização das bactérias probióticas visto que a literatura descreve desenvolvimento entre 2 a 4 dias de idade<sup>1</sup>



**Conclusão:** Com base nos resultados pode-se concluir que a metodologia de inoculação de probióticos in ovo não interfere nos parâmetros de incubação. Os probióticos empregados neste estudo não modularam a microbiota dos neonatos.

**Agradecimentos:** A empresa BioCamp pela doação dos probióticos e por todo auxílio prestado.

**Referências Bibliográficas:** 1.Amit-Romach E; Sklan D; Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16s ribosomal DNA primers. *Poult. Sci.* 2004; 83(7):1093-1098. 2.Araújo ICS; Café MB; Mesquita MA; et al. Effect of a commercial product containing canthaxanthin for in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidation status, and performance. *Poult. Sci.* 2020; 99:5598-5606. 3.Arreguin-Nava MA; Graham BD; Adhikari B; et al. Evaluation of in ovo *Bacillus* spp. based probiotic administration on horizontal transmission of virulent *Escherichia coli* in neonatal broiler chickens. *Poult. Sci.* 2019; (12)98:6483-6491. 4.Award WA; Ghareeb K; Abdel-Raheem S; et al. Effects of dietary inclusion of probiotic and symbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 2009; 88(1):49-56. 5.Donaldson EE; Stanley D; Hughes RJ; et al. The time-course of broiler intestinal microbiota development after administration of cecal contents to incubating eggs. *PeerJ.* [online] 2017; 20(5):e3587.6.Drider D; Fimland G; Héchard Y; et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; 70(2):564-582. 7.Macari M; Lunedo E; Pedroso AA. Microbiota intestinal de aves. In: Macari M, Mendes AA, Mentem JF, N??s IA. Editores. Produção de frango de corte. Campinas: FACTA; 2014. p. 299 – 319. 8.Oladokun S, Adewole DI. In ovo delivery of bioactive substances: an alternative to the use of antibiotic growth promoters in poultry production – a review. *J. Appl. Poult. Res.* 2020; 29(3):744-763.