



DANIEL RODRIGUES DUTRA

**PREBIÓTICO E PROBIÓTICO PARA LEITÕES
EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS COM
Escherichia coli K88+**

LAVRAS – MG

2011

DANIEL RODRIGUES DUTRA

**PREBIÓTICO E PROBIÓTICO PARA LEITÕES
EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS COM *Escherichia coli* K88+**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Coorientadores

Dra. Suely de Fátima Costa

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Dutra, Daniel Rodrigues.

Prebiótico e probiótico para leitões experimentalmente
desafiados com *Escherichia coli* K88+ / Daniel Rodrigues Dutra. –
Lavras : UFLA, 2011.

94 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Raimundo Vicente de Sousa.

Bibliografia.

1. Promotor de crescimento. 2. Saúde intestinal. 3. Suínos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.408557

DANIEL RODRIGUES DUTRA

**PREBIÓTICO E PROBIÓTICO PARA LEITÕES
EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS COM *Escherichia coli* K88+**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 01 de Julho de 2011.

Dr. Hunaldo Oliveira Silva	EAFSC
Dra. Suely de Fátima Costa	UFLA
Dr. Vinícius de Souza Cantarelli	UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

LAVRAS – MG

2011

OFEREÇO

Aos meus pais, Rita e Tadeu, pelo exemplo de caráter e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu padrasto Antônio Canedo, por acreditar em mim e tornar possível a concretização deste sonho.

À minha tia, Alcione, que sempre esteve ao meu lado, com seu carinho e atenção.

Ao Fred, parceiro sempre presente, por seu companheirismo, respeito e participação nesse momento ímpar em minha vida.

Ao meu amigo irmão, Willian, sinônimo de amizade sincera e verdadeira.

A todos os demais familiares, por todo incentivo e amor recebido.

A todos vocês, que me fazem sonhar e ser uma pessoa melhor a cada dia.

DEDICO

A Deus, por mais essa vitória alcançada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa FATEC, pelo financiamento da pesquisa.

Ao orientador, Prof. Raimundo Vicente de Sousa, pela orientação, amizade, respeito e confiança.

Ao professor Vinícius de Souza Cantarelli, pela coorientação, amizade e profissionalismo. Obrigado por toda confiança e colaboração em minha formação profissional.

À professora Suely de Fátima Costa, pela coorientação, amizade, dedicação e grande apoio na execução deste trabalho.

Aos professores Márcio Gilberto Zangerônimo e Priscilla Rochele Barrios, pelo envolvimento e participação no trabalho.

A todos do NESUI, em especial aos colegas Fernando, Rafael, Cesar, Hebert, Gustavo, Thiago, Renato, Asdrubal, Raquel, Letícia, Leonardo, Marseile, Louise, Carolina, Carlos Enrique, Nair e Gabriel, pela dedicação e companheirismo na condução do experimento.

Aos amigos Amália Saturnino, Danilo Rocha, Tiago Teófilo e Thiago Santos, pelo auxílio durante as análises histológicas.

À minha família Lavrense, Frederico, Willian, Luiz, Angélica, Diane, Matheus, Carolina, Valéria, Lívia e Daniela. Muito obrigado pelos bons momentos.

E, a todos os funcionários do DZO e DMV, pelo apoio necessário.

"Para ser persuasivo, precisamos ser confiáveis. Para ser confiáveis, precisamos ser dignos de crédito. Para ser dignos de crédito, precisamos ser autênticos."

Edward R. Murrow

BIOGRAFIA

DANIEL RODRIGUES DUTRA, filho de Lair Tadeu Dutra e Rita Maria Rodrigues da Silva, nasceu em 09 de junho de 1984, na cidade de Juiz de Fora, no estado de Minas Gerais.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em Zootecnia em janeiro de 2008.

Em julho de 2009, iniciou a pós-graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Lavras, concentrando seus estudos na área de Produção e Nutrição de Monogástricos.

Em julho 01 de julho de 2011, submeteu-se à defesa de dissertação para obtenção do título de “Mestre”.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar as propriedades prebióticas dos mananoligossacarídeos e probióticas do *Bacillus subtilis* em leitões experimentalmente infectados com *E. coli* K88+, um estudo foi conduzido no Centro Experimental de Suínos da UFLA em Lavras, MG. Foram utilizados 75 leitões (fêmeas e machos castrados), desmamados aos 28 dias de idade, com peso médio inicial de $8,44 \text{ kg} \pm 2,19 \text{ kg}$. Parâmetros de desempenho, população microbiana, morfometria intestinal, função imunológica, incidência de diarreia, pH e concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) no ceco e cólon foram analisados. O período experimental foi de 35 dias, com delineamento em blocos casualizados, composto pelos tratamentos: NCO – halquinol sem desafio imunológico (controle negativo); PCO – halquinol com desafio imunológico (controle positivo); MO – prebiótico com desafio imunológico; BS – probiótico com desafio imunológico; MOBS – prebiótico + probiótico com desafio imunológico, totalizando 5 tratamentos e 5 repetições. Os animais foram padronizados em função do peso ao desmame e alojados em grupos de três leitões por baía compondo a parcela experimental. As variáveis de desempenho não foram afetadas pelas dietas ($P > 0,05$). Entretanto, o uso dos aditivos proporcionou maior comprimento de intestino delgado ($P < 0,05$), apesar dos animais alimentados somente com o prebiótico apresentarem menor peso relativo de intestino delgado ($P < 0,05$). A população de *E. coli* total no íleo de animais não desafiados foi menor ($P < 0,05$), quando comparado aos demais tratamentos. Valores de pH cecal e do cólon não sofreram influência das dietas ($P > 0,05$). Contudo, as concentrações de ácido propiônico foram menores ($P < 0,05$) no ceco de animais recebendo suplementação probiótica ou prebiótica. As avaliações histológicas demonstraram que os animais alimentados somente com probiótico apresentaram menor altura de vilosidades intestinais no íleo ($P < 0,05$). A relação vilosidade:cripta foi maior no íleo do grupo controle positivo. Os níveis totais de IgA, IgG e IgM foram semelhantes ($P > 0,05$) em todos os tratamentos. Não houve casos de diarreia durante o período experimental. De maneira geral, os aditivos testados alteram a morfologia intestinal e a produção de AGV, e se mostram tão eficazes quanto o uso de antibiótico nas demais características avaliadas.

Palavras-chave: Mucosa intestinal. Promotor de crescimento. Saúde intestinal. Suínos. Vilosidade.

ABSTRACT

With the objective of evaluating the properties of the prebiotic manno-oligosaccharides and probiotic *Bacillus subtilis* in piglets experimentally infected with *E. coli* (10^{10} Colony Forming Units), a study was conducted at the Experimental Center of Swine of the UFLA, in Lavras, MG. A total of 75 piglets (females and castrated males), weaned at 28 days old, average initial weight of $8.44 \text{ kg} \pm 2.19 \text{ kg}$, was used. Performance parameters, microbial population, intestinal morphology, immune function, incidence of diarrhea, pH and short-chain fatty acid (SCFA) concentration in the cecum and colon were studied. The experimental period lasted 35 days, with randomized block design, consisting of the following treatments: NCO - halquinol without immunological challenge (negative control); PCO - halquinol with immunological challenge (positive control); MO - prebiotic with immunological challenge; BS - probiotic with immunological challenge; MOBS - probiotic + prebiotic immunological challenge; with a total of five treatments and five replications. The animals were standardized according to weight at weaning and housed in groups of three pigs per pen representing the plot. The performance variables were not affected by the diet ($P > 0.5$). However, the use of additives provided greater length of the small intestine ($P < 0.05$), while animals fed only the prebiotic presented lower relative weights of the small intestine ($P < 0.05$). Population of total *E. coli* in the ileum of animals not challenged was lower ($P < 0.05$) when compared to other treatments; pH values of the cecum and colon were not influenced by the diet ($P > 0.05$). However, the concentrations of propionic acid were lower ($P < 0.05$) in the cecum of animals fed either probiotic or prebiotic. Histological studies showed that animals fed only probiotics had a lower height of villi in the ileum ($P < 0.05$). The villous:crypt ratio was higher in the ileum of the control group. Total levels of IgA, IgG and IgM were similar ($P > 0.05$) in all treatments. No cases of diarrhea during the experimental period were found. In general, the tested additives alter both the intestinal morphology and VFA production, their being as effective as the use of antibiotic in the other parameters evaluated.

Keywords: Growth promoter. Gut health. Intestinal mucosae. Pigs. Villi.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Microbiota do trato gastrointestinal de leitões	13
2.2	Desmame e saúde intestinal	15
2.3	Prebióticos	17
2.3.1	Mecanismos de ação dos probióticos	19
2.3.2	Mananoligossacarídeos	20
2.4	Probióticos	22
2.4.1	Probióticos bacilares	24
	REFERÊNCIAS	27
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	42
	ARTIGO - Use of mannan oligosaccharides and <i>Bacillus subtilis</i> as growth promoters in weaning pigs challenged with <i>Escherichia coli</i>: Effects on microbiota and gut function	43
	ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

Para atuar de forma competitiva no cenário do agronegócio internacional, a suinocultura moderna tem de se adaptar a uma nova realidade de produção, adotando medidas tais como a substituição de antibióticos utilizados enquanto promotores de crescimento, por novos ingredientes dietéticos que também favoreçam um melhor desempenho produtivo. Além disso, deve disponibilizar ao mercado um produto final livre de resíduos, sem apresentar riscos à saúde do consumidor, em função de seu potencial tóxico e promoção da resistência microbiana aos antibióticos. Por este motivo, tornou-se crescente a restrição ao uso dessas substâncias como melhoradores de desempenho em diversos países, como na União Europeia, que em 2006 proibiu sua administração na alimentação animal. Dentre esses produtos alternativos, destacam-se os prebióticos e probióticos.

Os prebióticos são ingredientes não digestíveis, como por exemplo os mananoligossacarídeos, que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade metabólica de algumas bactérias benéficas, melhorando a resposta imunológica e preservando a integridade da mucosa entérica.

Os probióticos, por sua vez, são suplementos alimentares contendo culturas únicas ou mistas de microrganismos vivos, que por meio da simbiose com a microbiota nativa, favorecem o equilíbrio saudável da microflora intestinal.

Dessa forma, a utilização desses aditivos como possíveis substitutos aos antibióticos, faz-se uma importante estratégia nutricional para suínos em fase inicial de desenvolvimento, sobretudo no período pós-desmame, quando o leitão é submetido às extremas condições de estresse, acarretando em mudanças estruturais no trato digestório e alteração da microbiota.

Em resposta a essas modificações, ocorre a diminuição da capacidade de

digestão e absorção dos nutrientes da dieta, com conseqüente queda nos parâmetros de desempenho, além de estabelecer uma condição mais propícia a quadros de enfermidades e diarreia nos leitões.

Sendo assim, esse estudo teve como objetivo principal avaliar a eficácia de um prebiótico e um probiótico, bem como a associação desses, em melhorar o desempenho, a saúde intestinal, a incidência de diarreia e a resposta imune em leitões recém-desmamados desafiados com *Escherichia coli* K88+.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbiota do trato gastrointestinal de leitões

A população microbiana no trato digestório é de difícil mensuração. Estima-se que 90% da área do intestino de um animal monogástrico adulto seja habitada por mais de 400 espécies diferentes de microrganismos, o que representa 10 vezes mais bactérias no trato digestivo do que células no corpo do hospedeiro (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Em suínos, essa microbiota intestinal é altamente complexa e se estabelece após o nascimento (ALMEIDA, 2006). As superfícies e mucosas desses animais, antes estéreis em condições fetais, rapidamente sofrem colonização por diversos microrganismos logo ao entrar em contato com a mucosa vaginal materna. Bertechini e Hossain (1993) relataram a presença de *E.coli* no intestino de leitões duas horas após nascimento, enquanto que bactérias benéficas como o *Lactobacillus* spp. só foram observadas 18 horas depois.

Espécies patogênicas como *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* e *Clostridium* spp. se desenvolvem primariamente em função da baixa secreção de ácido clorídrico nas primeiras horas de vida do leitão, o que permite que bactérias tolerantes ao pH básico colonizem diferentes seções do trato intestinal

desfavorecendo a colonização por microrganismos benéficos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (RADECKI; YOKOYAMA, 1991).

Porém, com a ingestão contínua do leite da matriz, o pH estomacal reduz-se gradativamente, em função da produção de ácido láctico a partir da lactose, proporcionando condições para o crescimento de microrganismos anaeróbios benéficos como *Lactobacillus*, *Streptococcus lactis*, *S. faecalis* e *S. thermophilus* (SANCHES, 2004).

Durante a fase de aleitamento, o colostro e o leite controlam o crescimento bacteriano no intestino. Estima-se que 90% da microbiota normal de um suíno em aleitamento seja composta por bactérias anaeróbias consideradas benéficas, como *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp. e principalmente por aquelas produtoras de ácido láctico, como *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Os 10% restantes desta microbiota são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, destacando-se algumas cepas de *Escherichia coli*, *Clostridium* spp. e *Staphylococcus* spp. (HUYGHEBAERT, 2003).

Uma vez interrompida a ingestão do leite materno, a microbiota intestinal residente passa a ser muito variável (MORES; AMARAL, 2001), pois o leitão recém-desmamado apresenta menor quantidade de ácido láctico no estômago, devido a ausência da lactose. Este fato, aliado à insuficiente produção de ácido clorídrico pelas células parietais, eleva o pH (VIOLA; VIEIRA, 2003), propiciando uma queda na população de bactérias lácticas e o desenvolvimento de um meio favorável ao crescimento de microrganismos patógenos oportunistas.

Ainda assim, culturas básicas em meios não seletivos tem sugerido que bactérias Gram positivas dominam a microflora de suínos em fase inicial de desenvolvimento, sendo os *Streptococcus* e *Lactobacillus*, as espécies predominantes, com densidade de 10^7 a 10^9 UFC/g de mucosa (JOHNSON;

CONWAY, 1992; SCHIFFRIN; BLUM, 2002)

Dessa forma, somente aos 75 dias de vida, o leitão alcança plena capacidade de acidificar o estômago e porção inicial do intestino, ficando, durante esse período, predisposto à proliferação dos microrganismos patogênicos (SANCHES, 2004).

2.2 Desmame e saúde intestinal

O trato digestório de suínos em fase de desenvolvimento é um importante canal para a entrada de patógenos e para o desenvolvimento de doenças. Porém, uma microbiota equilibrada impede que microrganismos potencialmente patogênicos exerçam efeitos maléficos sobre o organismo do leitão (SAAD, 2006), preparando o intestino para futuramente se tornar um órgão associado ao sistema imunológico.

Ao momento da desmama, os suínos não apresentam o sistema imune totalmente desenvolvido (GASKINS; KELLEY, 1995; MELLOR, 2000). Essa insuficiente produção de anticorpos, associada à redução da imunidade passiva, predispõe os leitões jovens a doenças entéricas e respiratórias (KELLY; COUTTS, 2000; MELLOR, 2000; VIOLA; VIEIRA, 2003). Nesse período, os animais também são submetidos a diversas situações de estresse, como transferência de instalação, temperatura e umidade diferentes daquelas encontradas na maternidade, separação da mãe, interrupção da ingestão do leite materno, mudança brusca na forma física da dieta, transporte e reagrupamento social, contribuindo para a baixa ingestão de alimento (CASTILLO-SOTO et al., 2004).

Todas essas condições, propiciam um ambiente favorável à fixação de microrganismos patogênicos no trato entérico, os quais promovem modificações estruturais no intestino delgado, como o encurtamento das vilosidades e

alongamento das criptas e consequente redução da capacidade digestiva e absorptiva (PLUSKE, 2001).

Em leitões, a atrofia das vilosidades após a desmama é causada pelo aumento da taxa de perda celular e/ou redução da taxa de renovação celular. Essas alterações na morfologia da mucosa intestinal do leitão recém-desmamado são constatadas 24 horas após o desmame (MORAES, 2009). Elas se caracterizam, segundo Hampson e Kidder (1986), pela redução de aproximadamente 75% na altura das vilosidades em todos os segmentos do intestino delgado, e continuam assim até 15 dias após o desmame (CASTILLO-SOUTO et al., 2004).

Outro fato importante é a imaturidade do sistema digestório e as drásticas alterações que ocorrem na fisiologia intestinal dos leitões jovens (BOUDRY et al., 2004). A insuficiente produção de ácido clorídrico e de enzimas digestivas dificultam o aproveitamento das dietas formuladas à base de grãos (EASTER, 1993), comprometendo o desempenho e predispondo os leitões a problemas de saúde (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997).

O período pós desmame é, ainda, caracterizado em determinadas situações, pela ocorrência de diarreia de origem bacteriana ou motivada por mudança nutricional. As diarreias, além de retardarem o crescimento e piorarem a conversão alimentar em leitões, geram grandes perdas econômicas à suinocultura (MELIN et al., 1998; PEJSAK et al., 1998).

Nagy e Fekete (1999) propuseram que a colonização do intestino delgado por *E. coli* enterotoxigênica aderida ao epitélio é responsável pela maioria das lesões do trato digestivo observadas em leitões recém desmamados, assim como Tsiloyiannis et al. (2001) verificaram que a presença de *E.coli* foi associada à mortalidade de leitões, onde exames bacteriológicos revelaram a presença de *E.coli* b-hemolítica K88 positiva em leitões mortos.

Ao contrário, sabe-se, ainda, que a total ausência de bactérias no

ambiente pode comprometer tanto a fisiologia e morfologia intestinal quanto a imunologia local (INMAN et al., 2010; MULDER et al., 2009; NANTHAKUMAR et al., 2003; SNEL et al., 2002; UMESAKI et al., 1993; WAGNER, 2008). Kamimura (2006) estudando animais livres de colonização bacteriana em sua mucosa, verificou menor número de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria, em comparação com animais convencionais .

Tomando-se em conta que o trato gastrointestinal é a maior interface do sistema imunológico dos leitões com o meio exterior, a manutenção de um equilíbrio eubiótico da microbiota intestinal se faz, portanto, essencial para garantir o desempenho zootécnico, a saúde e o bem - estar animal.

2.3 Prebióticos

Quando falamos em aditivos utilizados como promotores de crescimento na produção animal, o que se tem em mente são os seus benefícios enquanto melhoradores de desempenho, baseados na melhoria dos índices zootécnicos. Porém, as informações quanto aos efeitos dessas substâncias sobre a saúde intestinal e sua interação com a microbiota anaeróbia digestiva são muitas das vezes inconclusivas, sobretudo em suínos (AUFREITER; KIM; O'CONNOR, 2011; MIKKELSEN; JAKOBSEN; JENSEN, 2003; MODESTO et al., 2009; MOUNTZOURIS et al., 2006; PIÉ et al., 2007; ROSSI; CALLEGARI; PULIMENO, 2011; SABATER-MOLINA et al., 2009; TZORTZIS et al., 2005).

Frente a essa situação, alguns carboidratos complexos, considerados como prebióticos, vêm sendo estudados com o objetivo de aliar ganhos em características produtivas e morfofisiológicas através do equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em iminentes condições de estresse (MATHEW; SUTTON; SCHEIDT, 1993; MOSENTHIN; BAUER, 2000; SILVA; NÖRNBERG, 2003).

O termo prebiótico foi empregado para designar nutrientes não digeríveis por enzimas (SAAD, 2006), resistentes à acidez gástrica, hidrólise ou absorção no trato gastrointestinal, porém com capacidade de estimular seletivamente o crescimento de uma ou mais bactérias benéficas no cólon e ceco (SILVA; NÖRNBERG, 2003), embora possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (GIBSON; ROBERFROID, 1995; GILLILAND, 2001; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; ROBERFROID, 2007).

Os principais representantes destas substâncias são alguns oligossacarídeos que agem diretamente no trato digestório, impedindo o estabelecimento de microrganismos patogênicos, além de promoverem um aumento na área de absorção intestinal em função da hiperplasia das vilosidades e atrofia das criptas (HOUDIJK; BOSH; TAMMINGA, 1999).

Muitos dos oligossacarídeos conhecidos ocorrem naturalmente, outros são produtos de hidrólise parcial, ácida ou enzimática de polissacarídeos ou de reações de transglicosilação, que ocorrem quando um outro açúcar age como aceptor ao invés da água (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Entre os oligossacarídeos que têm sido mais estudados como aditivos nas dietas de suínos estão os frutoligosacarídeos (FOS), galactoligosacarídeos (GOS), mananoligosacarídeos (MOS), transgalactoligosacarídeos (TOS) e Chitoligosacarídeos (BUDINO, 2007; CHE et al., 2011; LIU et al., 2010; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; PRICE et al., 2010; SMIRICKY-TJARDES, et al., 2003).

De modo geral, Budino (2007) em sua revisão, relata três respostas distintas quanto ao uso dos prebióticos na alimentação animal. A primeira refere-se à modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro. A segunda é a sua possível ação melhoradora sobre o sistema imune e sobre certos aspectos anatômicos do sistema digestivo. A terceira, é consequência direta destas duas

primeiras, e demonstra a influência do uso destes compostos sobre o desempenho animal (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

2.3.1 Mecanismos de ação dos prebióticos

A maioria dos prebióticos pode atuar enquanto substrato, estimulando o desenvolvimento de bactérias benéficas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no intestino grosso, as quais são conhecidas pela grande capacidade de produzir ácido láctico e ácidos graxos voláteis (AGV). O acetato, propionato e butirato são os principais produtos da fermentação desses compostos (GRIESHOP; REESE; FALEY, 2001). A maior produção destes ácidos promove a acidificação do cólon, o que provoca inibição no crescimento das populações de bactérias nocivas, como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella* sp. (MATHEW; SUTTON; SCHEIDT, 1993).

Outro efeito importante a ser considerado é a utilização do butirato como principal fonte de energia para os colonócitos, sendo um importante regulador do crescimento e diferenciação celular (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 1998). Parece haver uma preferência dos colonócitos para o metabolismo de butirato, que contribui diretamente como fonte de energia para estas células, podendo representar até 70% de seu consumo energético (SWANSON; FAHEY, 2006).

O suprimento de butirato ajuda a manter a integridade da mucosa, desempenhando importante papel na manutenção de um fenótipo celular normal e redução do risco de carcinomas colônicos (NRC, 2006). Outras funções dos ácidos graxos incluem: alteração do fluxo sanguíneo e da atividade muscular no cólon, estimulação da produção de mucina e proliferação de enterócitos.

Já o acetato e propionato são prontamente absorvidos e entram na corrente sanguínea, sendo fonte de energia extra para o hospedeiro.

Alguns oligossacarídeos como os mananos, podem agir como adsorventes de agentes enteropatogênicos, atuando diretamente sobre a *E. coli* e *Salmonella* sp., impedindo a proliferação destas populações no sistema digestivo (SILVA; NÖRNBERG, 2003), o que resulta em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa (TUCCI, 2003).

Os prebióticos também atuam de forma indireta no sistema imunológico, por promoverem o crescimento das populações de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estas têm a capacidade de produzirem substâncias com propriedades imunoestimulatórias e interagir com o sistema imune em vários níveis, incluindo a produção de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrofágica e a indução da síntese de imunoglobulinas, em especial, as IgA's (BUDINO, 2007; SILVA; NÖRNBERG, 2003).

De modo geral, o uso de prebióticos promove aumento na área de absorção de nutrientes da mucosa intestinal, o que pode ser fundamental para um melhor desempenho animal (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

2.3.2 Mananoligossacarídeos

Entre as substâncias classificadas como prebióticos, os mananoligossacarídeos (MOS) tem demonstrado efeitos interessantes em suínos (DAVIS et al., 2002; POEIKHAMPHA; BUNCHASAK, 2011; SHEN et al., 2009), sobretudo em parâmetros de produtividade, controle de patógenos e preservação da integridade da mucosa intestinal, modulando várias propriedades do sistema imunológico (WALTZ; GITRRBACH; ROLLER, 2005).

Esses compostos são derivados da parede celular de leveduras *Sacharomyces cerevisiae*, obtidos através de fermentação industrial, pelo qual a parede celular da levedura é desmembrada em porção interna e externa por

tratamento enzimático (KAMIMURA, 2006). Essa fração externa contém uma estrutura complexa de manose fosforilada e glicoproteína (SPRING, 1996 apud LODDI, 2000).

O mecanismo de ação dos MOS na seleção da microbiota intestinal é diferenciado em relação à maioria dos demais oligossacarídeos utilizados como prebióticos (AQUINO, 2009). Eles atuam como ligantes de alta afinidade, proporcionando um meio de aglutinação competitivo para determinados tipos de bactérias gram-negativas específicas, através da sua interação com lectinas sensíveis à manose presente na superfície dessas bactérias (SPRING et al., 2000; UTIYAMA, 2004). Cardozo (2006) e Kamimura (2006) citaram que além de evitar a adesão dos patógenos no intestino, os MOS também retiram patógenos aderidos recentemente a mucosa.

Lou (1995 citado por KAMIMURA, 2006), relatou que a suplementação de MOS à dieta diminuiu a proporção de grupos específicos de bactérias gram-negativas resistentes aos antibióticos nas fezes de suínos.

Ao avaliar a frequência de diarreia em leitões recém-desmamados, Utiyama et al. (2006) constataram que o uso de 0,3% de MOS foi eficaz em reduzir sua ocorrência. O mesmo efeito foi verificado por Grela, Semeniuk e Czech (2006), ao avaliarem a adição de 0,3% de MOS em dietas para leitões desmamados aos 28 dias de idade, constatando que o uso de prebiótico diminuiu a incidência de diarreia e promoveu melhor resposta no desempenho dos animais.

A utilização de MOS na dieta de leitões recém-desmamados causou, em média, um aumento de 4,4% no ganho diário de peso (UTIYAMA, 2004), que é inferior aos 16% proporcionados pelos antimicrobianos promotores de crescimento (NRC, 1998)

Miguel, Rodriguez-Zas e Pettigrew (2004), ao analisarem dados de 54 experimentos, verificaram aumentos de 4,12% no ganho de peso, 2,11% no

consumo de ração e 2,29% na eficiência alimentar de leitões que receberam dietas contendo MOS como prebiótico. Castillo et al. (2008), ao utilizarem 0,2% de MOS nas dietas iniciais de leitões, também observaram melhorias na eficiência alimentar dos animais que consumiram o prebiótico em relação àqueles que receberam dietas contendo zinco na forma orgânica e à dieta controle (sem adição de promotor de crescimento).

Por outro lado, dietas suplementadas com mananoligossacarídeos ou combinação de mananoligossacarídeos com acidificante e probiótico propiciam ganho de peso, conversão alimentar e altura de vilosidades ao nível de duodeno semelhantes a dietas suplementadas com colistina e avilamicina para leitões de 21 a 49 dias de idade em condições de desafio sanitário (CORASSA et al., 2006).

Em seu trabalho, Swanson et al. (2002), constataram que o MOS é capaz de aumentar os níveis séricos de imunoglobulinas G e A no sangue e IgA ileal quando adicionados com frutoligossacarídeos.

Os mananos também foram efetivos em modular o sistema imune, aumentando a concentração de imunoglobulina A em conteúdo cecal de ratos (KUDOH et al., 1999) e alterando respostas imuno específicas e não específicas, com aumento de desempenho de leitões (SOHN et al., 2000).

Portanto, pesquisas com mananoligossacarídeos devem ser aprofundadas, de modo contínuo, a fim de otimizar sua utilização na suinocultura moderna como reguladores da microbiota entérica, mantenedores da integridade da mucosa intestinal, melhoradores de desempenho e imunomoduladores.

2.4 Probióticos

A utilização de probióticos na alimentação animal se baseia na

insuficiente capacidade da microbiota entérica em suportar um ótimo desempenho produtivo (MORAES, 2009).

Segundo um conceito abrangente proposto por Walker e Duffy (1998), probióticos são suplementos microbianos vivos formados por bactérias e/ou fungos específicos, capazes de melhorar o equilíbrio microbiano no intestino, uma vez que provocam a redução de agentes patogênicos e estimulam o sistema imune do hospedeiro, atuando na prevenção de distúrbios intestinais e promovendo melhora do desempenho animal, como já demonstrado em diversos estudos com suínos (BIRD et al., 2009; BOMBA et al., 2002; KONSTANTINOV et al., 2008; LESSARD et al., 2009; MARTIN et al., 2009; PIEPER et al., 2009; SZABO et al., 2009; WANG et al., 2009),

Vários microrganismos têm sido usados como probióticos, sobretudo em leitões desmamados, entre eles destacam-se as bactérias lácticas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*; além de outros, como o *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyoi*, *Aspergillus oryzae*, *Torulopsis sp.* E *Bifidobacterium bifidum* (CHIQUEIRI, 2003; CHOI et al., 2011; GUPTA; GARG, 2009).

Os probióticos reforçam a microbiota intestinal, principalmente em condições adversas como mudanças na alimentação, desafio imunológico, tratamento com antibióticos, estresse social e ambiental (CARDOZO, 2006). Porém, se as condições sanitárias forem adequadas, se os animais não sofrerem quaisquer tipos de estresse e a flora intestinal estiver equilibrada, os probióticos terão pouco efeito sobre o desempenho animal. Entretanto, nas criações comerciais existentes nos dias atuais, é difícil um animal que não sofra estresse ou que viva em ambiente livre de microrganismos (AVCARE LIMITED, 2003).

Além de promover resistência gastrointestinal aos patógenos, os probióticos são descritos por promover o aumento da tolerância e digestão

da lactose, aumentar a absorção de minerais, produzir vitaminas, modular o sistema imunológico, auxiliar no tratamento da diarreia e por seus efeitos anti-carcinogênicos (BORGES; SALGARELLO; GURIAN, 2003; COLLADO et al., 2009; DORON; HIBBERD; GORBACH, 2008; LOMAX; CALDER, 2009; MARCHESI; SHANAHAN, 2007; PARKES; SANDERSON; WHELAN, 2009), entretanto, seus mecanismos de ação ainda necessitam ser claramente elucidados (ROSELLI et al., 2007).

O que tem sido proposto é que cepas probióticas atuam por diferentes mecanismos no organismo dos suínos, como por exemplo: exclusão competitiva e antagonismo direto (MENTEN, 2001); estímulo ao sistema imune (SZABO et al., 2009; SCHAREK et al., 2007); efeito nutricional (LEEDLE, 2000); supressão da produção de amônia (CHIQUIERI, 2003) e neutralização de enterotoxinas (JIN; HO; ZHAO, 1997).

As características desejáveis para uma cultura ser considerada probiótica são: capacidade antagônica às bactérias intestinais indesejáveis, caráter não patogênico e não tóxico, ser ácido resistente, estável durante a estocagem, viável por longos períodos de tempo, conter no mínimo $3,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia por grama e competir com microrganismos patógenos, promovendo efeitos benéficos ao hospedeiro (BURITI et al., 2005; SHIM, 2005).

2.4.1 Probióticos bacilares

Há probióticos que não têm a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, como é o caso do *Bacillus subtilis*, que apenas transitam pelo intestino juntamente com o conteúdo intestinal e não aderem ao epitélio. Contudo, atingem o lúmen do intestino com maior número de microrganismos viáveis quando comparado ao *Lactobacillus acidophilus*, por exemplo. Isto se deve ao fato de estarem na forma esporulada e, conseqüentemente, não serem

destruídos durante o processamento da ração (COPPOLA; TURNES, 2004). O gênero *Bacillus* é resistente ao calor, umidade, calor seco, à radiação ultravioleta, à radiação gama, agentes oxidantes e pressão (KÜRTI, 2004), apresenta fácil preparação e menor custo para processos de produção (SILVA et al., 2006), o que o torna uma alternativa em potencial ao uso de antibióticos.

Outro ponto forte na utilização de *Bacillus subtilis*, é sua capacidade em inibir o crescimento de patógenos como *Clostridium perfringens*, o qual adquiriu resistência a antibióticos promotores de crescimento tais como bacitracina e a lincomicina, promovendo distúrbios intestinais em leitões lactentes e altos índices de mortalidade pré-desmame (COSTA et al., 2004)

Yeow e Hai (2005) isolaram o *Bacillus subtilis* do trato entérico de aves, confirmando sua atividade inibitória *in vitro* de *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Streptococcus pneumoniae*.

Utilizando-se um pool de probióticos à base de *Bacillus subtilis*, *B. natto*, *B. megaterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, *S. faecalis*, *S. termophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*, Huaynate et al. (2006) verificaram que leitões recém-desmamados recebendo doses de 200 e 300 ppm deste produto, apresentaram menor porcentagem de diarreia em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu 100 ppm, verificando a eficácia de sua dosagem.

Em se tratando de estímulo ao sistema imune, a utilização de probióticos à base de *Bacillus* também pode aumentar a ativação de macrófagos e células T e induzir aumento dos níveis séricos de interferon (SANCHES, 2004)

Chiquieri (2003), Utiyama (2004) e Silva et al. (2006) citaram que *Bacillus subtilis*, ao ser utilizado em humanos e animais, promoveu aumento da secreção de imunoglobulina A.

Há, também, evidências dos efeitos benéficos na promoção do

crescimento com o uso de probióticos bacilares em suínos (BHANDARI et al., 2008; BUDIÑO et al., 2006; CHOI; SUH; KIM, 2011; DAVIS et al., 2008; KRITAS; MORRISON, 2007; MORAES, 2009; SILVA et al., 2006; UTIYAMA et al., 2006)

Nos experimentos de Alexopoulos et al. (2004, 2006), foram utilizadas cepas de *B. subtilis* + *B. licheniformis* ($1,28 \times 10^6$ esporos/g) e *B. toyoi* ($0,5 \times 10^9$ esporos/g) em matrizes suínas das duas semanas precedentes ao parto até o término da lactação, no qual verificou-se que essas fêmeas perderam menos peso, consumiram mais ração e produziram leite com maior teor proteína e lipídeos quando comparadas ao grupo controle. Os efeitos prebióticos estenderam-se também aos leitões, observadas menor taxa de mortalidade, maior ganho de peso e menor frequência de diarreia durante o período pré-desmame.

Entre algumas ações dos microrganismos *B. subtilis*, estão a secreção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, as quais auxiliam na transformação de compostos pouco solúveis ou não digestíveis em compostos altamente solúveis. Assim, promovem maior digestibilidade de nutrientes reduzindo a disponibilidade de substratos para bactérias patogênicas (KÜRTI, 2004).

Além desses mecanismos, há indicações de que esses probióticos aumentam o aproveitamento das proteínas, melhorando a saúde e o crescimento animal, por reduzirem a produção intestinal de amônia, como verificado por Shim (2005), que ao utilizar cepas de *Bacillus* e também de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Aspergillus*, verificaram diminuição da concentração de amônia nas fezes.

Entretanto, os efeitos descritos devem ser limitados às estirpes analisadas em cada estudo e não extrapolados e generalizados para a espécie ou para outros probióticos (BADARÓ et al., 2009), o que propicia uma grande variabilidade dos resultados encontrados com seu uso.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. et al. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 88, n. 11/12, p. 381-392, Dec. 2004.

ALEXOPOULOS, C. et al. Probiosis in sows by administration of *Bacillus toyoi* spores during late pregnancy and lactation: effect on their health status/performance and on litter characteristics. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, Coppel, v. 1, n. 1, p. 33-40, Feb. 2006.

ALMEIDA, E. **Utilização do probiótico Protexin® em leitões na fase de creche, submetidos ao desafio com *Escherichia coli***. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

AQUINO, A. A. **Extrato seco de parede de levedura em dietas para gatos adultos**. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

AUFREITER, S.; KIM, J. H.; O'CONNOR, D. L. Dietary oligosaccharides increase colonic weight and the amount but not concentration of bacterially synthesized folate in the colon of piglets. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 141, n. 3, p. 366-372, Jan. 2011.

AVCARE LIMITED. **The role of enteric antibiotics in livestock production**. Canberra, 2003. Disponível em:
<<http://www.animalhealthalliance.org.au/files/animalhealth/information/The%20Role%20of%20enteric%20antibiotics%20in%20livestock%20production.pdf>>.
Acesso em: 30 jul. 2010.

BADARÓ, A. C. L. et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana parte 2. **Revista Nutrir Gerais**, Ipatinga, v. 3, n. 4, p. 396-416, fev./jul. 2009.

BERTECHINI, A. G.; HOSSAIN, S. M. **O fantástico mundo dos probióticos**. Campinas: Biotecnal, 1993. 97 p.

BHANDARI, S. K. et al. Evaluation of alternatives to antibiotics using an Escherichia coli K88+ model of piglet diarrhoea: effects on gut microbial ecology. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 836-847, Apr. 2008.

BIRD, A. R. et al. Comparative effects of a high-amylose starch and a fructooligosaccharide on fecal bifidobacteria numbers and short-chain fatty acids in pigs fed Bifidobacterium animalis. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 54, n. 5, p. 947-954, May 2009.

BOMBA, A. et al. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, p. 95-99, Sept. 2002. Supplement 1.

BORGES, F. M.; SALGARELLO, R. M.; GURIAN, T. M. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 3., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Alimentação Animal, 2003. p. 21-60.

BOUDRY, G. et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglets intestine. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 9, p. 2256-2262, Sept. 2004.

BUDIÑO, F. E. L. et al. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarreia e contagem de coliformes totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p. 59-67, 2006. Suplemento.

BUDIÑO, F. E. L. **Probióticos e prebióticos na alimentação de leitões.**

Piracicaba, 2007. Disponível em:

<www.infobibos.com/Artigos/2007_4/suinos/index.htm>. Acesso em: 26 jun. 2010.

BURITI, F. C. A. et al. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 2, p. 173-180, Mar. 2005.

CARDOZO, E. C. **Utilização de probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos.** 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CASTILLO, M. et al. Use of mannan-oligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: effects on microbiota and gut function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 94-101, Jan. 2008.

CASTILLO-SOTO, W. L. et al. Efeito da substituição do farelo de soja pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte proteica em dietas para leitões desmamados sobre a morfologia intestinal e atividade das enzimas digestivas intestinais. **Archivos LatinoAmericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v. 12, n. 1, p. 21-27, jan./abr. 2004.

CHE, T. M. et al. Mannan oligosaccharide improves immune responses and growth efficiency of nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 2010-3208, Aug. 2011.

CHIQUIERI, J. **Probióticos e prebióticos na alimentação de suínos em crescimento e terminação.** 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2003.

CHOI, J. Y. et al. Effect of potential multi-microbe probiotic product processed by high drying temperature and antibiotic on performance of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2009-2794, July 2011.

CHOI, Y. M.; SUH, H. J.; KIM, J. M. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU- 10. **Journal Protein Chemistry**, New York, v. 20, n. 4, p. 287-292, May 2001.

COLLADO, M. C. et al. The impact of probiotic on gut health. **Current Drug Metabolism**, Boca Raton, v. 10, n. 1, p. 68-78, Jan. 2009.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, jul./ago. 2004.

CORASSA, A. et al. Níveis de ácido fólico em dietas contendo ácido fórmico para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 2, p. 462-470, mar./abr. 2006.

COSTA, G. M. et al. Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 401-404, jun. 2004.

DAVIS, M. E. et al. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing/finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1459-1467, June 2008.

DAVIS, M. E. et al. Effect of dietary mannan oligosaccharides and(or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 11, p. 2887-2894, Nov. 2002.

DORON, S. I.; HIBBERD, P. L.; GORBACH, S. L. Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 42, p. 58-63, July 2008. Supplement 2.

EASTER, R. A. Acidification of diets for pigs. In: RECENT DEVELOPMENTS IN PIG NUTRITION, 2., 1993, Nottingham. **Proceedings**... Nottingham: Nottingham University, 1993. p. 256-266.

GASKINS, H. R.; KELLEY, K. W. Immunology and neonatal mortality. In: VARLEY, M. A. **The neonatal pig**: development and survival. Wellingford: CAB International, 1995. p. 39-56.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, June 1995.

GILLILAND, S. E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Ed.). **Applied dairy microbiology**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2001. p. 327-343.

GRELA, E. R.; SEMENIUK, V.; CZECH, A. Efficacy of fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides in piglet diets. **Medycyna Weterynaryjna**, Warszawa, v. 62, n. 7, p. 762-766, July 2006.

GRIESHOP, C. M.; REESE, D. E.; FALEY, G. C. Non starch polysaccharides and oligosaccharides in swine nutrition. In: LEWIS, A. J.; SOUTHEM, L. L. (Ed.). **Swine nutrition**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 108-125.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal Medical Microbiology**, Chandigarh, v. 27, n. 3, p. 202-209, July/Sept. 2009.

HAMPSOM, D. J.; KIDDER, D. E. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. **Research Veterinary Science**, London, v. 40, n. 1, p. 24-31, Jan. 1986.

HOUDIJK, J. G. M.; BOSH, M. W.; TAMMINGA, S. Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 148-158, Jan. 1999.

HUAYNATE, R. A. R. et al. Effect of adding macro and micro minerals in pigs feces fed diets with different levels of probiotic. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 385-392, May 2006.

HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry In: EASTERN NUTRITION CONFERENCE, 1., 2003, Quebec. **Anais...** Quebec: UON, 2003. p. 1-23.

INMAN, C. F. et al. Rearing environment affects development of the immune system in neonates. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 160, n. 3, p. 431-439, June 2010.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ZHAO, X. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 53, n. 4, p. 351-368, Dec. 1997.

JONSSON, E.; CONWAY, P. Probiotics for pigs. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992. chap. 11, p. 259-316.

KAMIMURA, R. **Mananoligossacarídeos e colistina na dieta de leitões desmamados**. 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

KELLY, D.; COUTTS, A. G. P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 161-167, Oct. 2000.

KONSTANTINOV, S. R. et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 1191-1199, July 2006.

KRISTAS, S. K.; MORRISON, R. B. Effect of orally administered *Lactobacillus casei* on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccination in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 2/4, p. 248-255, Jan. 2007.

KUDOH, K. et al. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 45, n. 2, p. 173-181, Apr. 1999.

KÜRTI, P. Microbial balance and optimal digestion in pigs. **International Pig Topics**, Hørsholm, v. 16, n. 7, p. 11-13, Oct. 2004.

LEEDLE, J. Probiotics and DFM's – Mode of action in the gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2000. p. 25-40.

LESSARD, M. et al. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 3, p. 922-934, Mar. 2009.

LIU, P. X. S. et al. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* k88. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 3871-3879, Dec. 2010.

LODDI, M. M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

LOMAX, A. R.; CALDER, P. C. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 15, n. 13, p. 1428-1518, May 2009.

MARCHESI, J.; SHANAHAN, F. The normal intestinal microbiota. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 20, n. 5, p. 508-513, Oct. 2007.

MARTIN, R. et al. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 76, n. 4, p. 418-425, Nov. 2009.

MATHEW, A. G.; SUTTON, A. L.; SCHEIDT, A. B. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weaning pig. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 6, p. 1503-1509, June 1993.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, n. 2/3, p. 173-182, 2002.

MELIN, L. et al. Sensitivity to quinolones and zinc oxide in coliform bacteria from weaned piglets. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998, Birmingham. **Proceedings...** Birmingham: IPVS, 1998. p. 213.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotics. **Pig Progress**, Doetinchem, v. 16, n. 1, p. 18-21, 2000.

MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 141-157.

MIGUEL, J. C.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; PETTIGREW, J. E. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 12, n. 6, p. 296-307, Nov./Dec. 2004.

MIKKELSEN, L. L.; JAKOBSEN, M.; JENSEN, B. B. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets postweaning. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 109, n. 1/4, p. 133-150, Oct. 2003.

MODESTO, M. et al. A novel strategy to select Bifidobacterium strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 248-258, June 2009.

MORAES, K. M. C. M. T. **Probióticos para leitões lactentes e em fase de creche**. 2009. 34 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MORES, N.; AMARAL, A. L. Patologias associadas ao desmame. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 10., Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001. p. 215-224.

MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The potential use of prebiotics in pig nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul. **Proceedings...** Seoul: Seoul National University, 2000. p. 515-528.

MOUNTZOURIS, K. C. et al. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. **Anaerobe**, London, v. 12, n. 4, p. 178-185, Aug. 2006.

MULDER, I. E. et al. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. **BMC Biology**, Bethesda, v. 7, n. 1, p. 79, 2009.

MUSSATO, S. I.; MANCHILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 68, n. 3, p. 587-597, Apr. 2007.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 30, n. 2/3, p. 259-284, May/June 1999.

NANTHAKUMAR, N. N. et al. The role of indigenous microflora in the development of murine intestinal fucosyl- and sialyltransferases. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 17, n. 1, p. 44-46, Jan. 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy of Science, 2006. 398 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine**. 10th ed. Washington: National Academic of Science, 1998. 245 p.

PARKERS, G. C.; SANDERSON, J. D.; WHELAN, K. The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 9, n. 4, p. 237-244, Apr. 2009.

PEJSAK, Z. et al. The effects of zinc supplementation on pig productivity and zinc concentration in tissues. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998, Birmingham. **Proceedings...** Birmingham: IPVS, 1998. p. 17.

PIÉ, S. et al. Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 3, p. 673-683, Mar. 2007.

PIEPER, R. et al. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/ 8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 227-232, Apr. 2009.

PLUSKE, J. R. Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig. In: PIVA, A.; KNUDSSON, K. E. B.; LINDBERG, J. E. (Ed.). **Gut environment of pigs**. Nottingham: Nottingham University, 2001. p. 01-28.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, J. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 51, n. 1/3, p. 215-236, Nov. 1997
POEIKHAMPHA, T.; BUNCHASAK, C. Comparative effects of sodium gluconate, Mannan oligosaccharide and potassium diformate on growth performances and small intestinal morphology of nursery pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Bancoc, v. 24, n. 6, p. 844-850, 2011.

PRICE, K. L. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 3896-3908, Dec. 2010.

RADECKI, S. V.; YOKOYAMA, M. T. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; LEWIS, A. (Ed.). **Swine nutrition**. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 439-447.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 137, n. 11, p. 2493-2502, Nov. 2007. Supplement.

ROSELLI, M. et al. The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 137, n. 12, p. 2709-2716, Dec. 2007.

ROSSI, F.; CALLEGARI, M.; PULIMENO, A. Effect of fructo-oligosaccharides and lactic acid bacteria on caecal swine fermentation: in vitro trials. **Italian Journal of Animal Science**, Parma, v. 2, n. 1, p. 415-417, Mar. 2011.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 42, n. 1, p. 01-16, Jan. 2006.

SABATER-MOLINA, M. et al. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 65, n. 3, p. 315-328, 2009.

SANCHES, A. L. **Probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame**. 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SCHAREK, L. et al. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 61, n. 4, p. 223-234, Aug. 2007.

SCHIFFRIN, E. J.; BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 56, p. 60-64, Aug. 2002. Supplement 3.

SHEN, Y. B. et al. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2614-2624, Aug. 2009.

SHIM, S. B. **Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of young pigs**. 2005. 179 p. Thesis (Doctorate in Animal Nutrition) - Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, 2005.

SILVA, C. A. et al. Avaliação de probióticos (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho dos leitões. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p.133-140, jan./mar. 2006.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 55-65, jul./ago. 2003.

SMIRICK-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2535-2545, Oct. 2003.

SNEL, J. et al. Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals and its potential to improve intestinal health. In: BLOCK, M. C. **Nutrition and health of the gastrointestinal tract**. Wageningen: Wageningen Academic, 2002. chap. 2, p. 37-69.

SOHN, K. S. et al. The role of immunostimulants in monogastric animal and fish: review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Suweon, v. 13, n. 8, p. 1178-1187, 2000.

SPRING, P. et al. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 205-211, Feb. 2000.

SWANSON, K. S. et al. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannan oligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial population in adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 56, n. 4, p. 309-318, 2002.

SWANSON, K. S.; FAHE JUNIOR, G. C. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. In: LAUE, D. K.; TUCKER, L. A. (Ed.). **Recent advances in pet nutrition**. Nottingham: Nottingham University, 2006. p. 19-35.

SZABO, I. et al. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 9, p. 2621-2628, May 2009.

TSILOYIANNIS, V. K. et al. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. **Research in Veterinary Science**, London, v. 70, n. 3, p. 287-293, June 2001.

TUCCI, F. M. **Efeitos da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a renovação celular da mucosa intestinal, enzimas digestivas e desempenho**. 2003. 84 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

TZORTZIS, G. et al. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 135, n. 7, p. 1726-1731, July 2005.

UMESAKI, Y. et al. Expansion of alpha beta Tcell receptor bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. **Immunology**, Bethesda, v. 79, n. 1, p. 32-37, May 1993.

UTIYAMA, C. E. **Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais, como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados**. 2004. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

UTIYAMA, C. E. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, dez. 2006.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Ácidos orgânicos e suas misturas em dietas de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. p. 255-284.

WAGNER, R. D. Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. In: HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. **GI microbiota and regulation of the immune system**. New York: Springer Science, 2008. chap. 4, p. 41-56. (Advances in experimental medicine and biology, v. 635).

WALKER, W. A.; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 9, n. 12, p. 668-675, Dec. 1998.

WALTZ, B.; GIRRBACH, S.; ROLLER, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. **Brazilian Journal of Nutrition**, Campinas, v. 93, n. 1, p. 49-55, Mar. 2005.

WANG, A. N. et al. Influence of *Lactobacillus fermentum* I5007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. **Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 89-98, June 2009.

YEOW, A. L. T.; HAI, M. T. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 418-4190, Aug. 2005.

ARTIGO

Use of mannan oligosaccharides and *Bacillus subtilis* as growth promoters in weaning pigs challenged with *Escherichia coli* K88+: Effects on microbiota and gut function

Artigo submetido à revista *Animal Feed Science and Technology*.

Use of mannan oligosaccharides and *Bacillus subtilis* as growth promoters in weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K88+: Effects on microbiota and gut function

D. R. Dutra^{a*}, R. V. Sousa^a, V. S. Cantarelli^b, S. F. Costa^a, M. G. Zangerônimo^a
and F. M. Carvalho Júnior^a

^a*Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brazil*

^b*Department of Animal Science, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, Minas Gerais, Brazil*

*Corresponding author. Tel: 55 35 9139-8717; EM: danielrdutra@hotmail.com

Submitted to Animal Feed Science and Technology in August 2011

Abstract

In this study, both the effect of mannan oligosaccharides, *Bacillus subtilis* and their combination were evaluated on growth performance, gastrointestinal health and immune response in weanling pigs. A total of 75 piglets (females and castrated males), weaned at 28 d, average initial weight of 8.44 kg \pm 2.19 kg, were housed in 25 pens with randomized blocks design. Animals were given 5 treatment diets, including a negative control diet containing 200 mg/kg of halquinol (NCO), a positive control diet containing 200 mg/kg of halquinol (PCO), a diet with mannan-oligosaccharides, 1,500 mg/kg (MO), another diet with *Bacillus subtilis*, 5×10^8 cfu/kg (BS) and a diet with both the additives (MOBS). The groups of animals PCO, MO, BS and MOBS were orally challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+. The experiment lasted 35 d. BW was recorded and daily feed intake was calculated. Fecal consistency was monitored throughout the experimental period. After 3 wk, 25 animals were slaughtered. Samples of intestinal contents were collected to determine the concentration of lactic acid and short chain fatty acids (SCFA), intestinal pH, lactobacillus and population of enterobacteria. Histology and morphometry of small intestine and concentration of immunoglobulins were also evaluated. Performance parameters were not affected by the diet ($P>0.05$). However, the use of additives provided greater length of the small intestine ($P<0.05$), while animals fed MO diet showed lower relative weight of the small intestine

($P < 0.05$). Population of total *E. coli* in the ileal content of unchallenged animals was lower ($P < 0.05$). The concentration of propionic acid was lower ($P < 0.05$) in the caecum of animals fed either BS or MO diets. Animals fed BS diet had lower height of villi in the ileum ($P < 0.05$). Villous: crypt ratio was higher in the ileum of the PCO group. No significant differences ($P > 0.05$) were recorded in pH or serum and the ileal immunoglobulin concentrations. No cases of diarrhea were reported. In conclusion, MO, MOBS and BS diets had benefit similar to the diets supplemented with antibiotic to improve growth performance, in addition to altering the morphology of the small intestine of weanling pigs. However, further studies are needed to better understand their mode of action.

Keywords: Intestinal health, intestinal morphology, piglets, post-weaning diarrhea, prebiotic, probiotic

Abbreviations: ADFI, average daily feed intake gain; ADG, average daily gain; BS, diet with *Bacillus subtilis*; BW, body weight; CP, crude protein; D, day(s); ETEC, enterotoxigenic *Escherichia coli*; F:G, feed conversion; H, hours; IgA, immunoglobulin A; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; ME, metabolizable energy; MO, diet with mannan-oligosaccharides; MOBS, a diet with both the additives; MOS, mannan-oligosaccharides; NCO, negative control diet; PCO, positive control diet; SCFA, short-chain fatty acids; WK, week(s).

1. Introduction

Enteric disease and immune challenge are processes that have

detrimental effects on the growth performance of young swine (Davis et al., 2010), especially in weaned piglets, which suffer from gastroenteritis caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88+ (Setia et al., 2009). The traditional way to control this problem is to include subtherapeutic doses of antibiotics in the feed, but this is no longer acceptable to consumers, thus, alternatives to antibiotics are needed.

Enhancing normal gut flora and targeting intestinal pathogens through nonantibiotic approaches might improve food safety and reduce antibiotic residues (Forshell & Wierup, 2006; Ojha & Kostrzynska, 2007). In this regard, several commercially available feed additives and ingredients have proven useful in improving health and productive performance of pigs (Stein & Kil, 2006; Castillo et al., 2008; Kiarie et al., 2008; Gebru et al., 2010).

One of the supplements that has been effective in the replacement of antibiotics is the *Bacillus* direct-fed microbial (Bhandari et al., 2008; Choi et al., 2011). They are probiotics, and refer to a group of nonpathogenic organisms that when administered in sufficient numbers are known to have beneficial effects on the host animal's health by improving their intestinal microbial balance (Reid et al., 2003).

Dietary oligosaccharides also have been shown to improve performance and enhance the host's health status (Liu et al. 2010). Furthermore, dietary oligosaccharides, such as mannan-oligosaccharides (MOS), used not only as a

growth promoter for helpful bacteria, but also effectively inhibit the growth and activity of pathogenic microorganisms (Castillo et al., 2008; Price et al., 2010).

Therefore, the present study was designed to evaluate the effect of diets containing MOS, probiotic strains or their combination, to enhance growth performance, gastrointestinal health and immune response in weanling pigs orally challenged with ETEC K88+.

2. Materials and methods

The experimental protocol used in this study was approved by the bioethical committee of Federal University of Lavras, Brazil.

2.1. Animals and Diets

A total of 75 piglets [Large White x (Large White X Pietrain)], females and castrated males, were selected from the Experimental Center of Swine, of the Department of Animal Science at the Federal University of Lavras. The facilities of the nursery room were cleaned, disinfected and kept unused for 7 d before the experiment. Animals were weaned at 28 d of age, initial BW of 8.44 ± 2.19 kg, randomized in blocks and housed in 25 pens (three pigs in each pen). The experimental units were arranged so that there would always be an empty pen between them in order to avoid contact between pigs of different treatments. Dietary treatments were: 1) a negative control diet with 200 mg/kg growth promoter and no challenge (NCO), 2) a positive control diet with 200 mg/kg

growth promoter (PCO), 3) a diet with mannan-oligosaccharides, 1,500 mg/kg (MO), 4) 5×10^8 cfu/kg *B. subtilis* (BS) and 5) 1,500 mg/kg mannan-oligosaccharides + 5×10^8 cfu/kg *B. subtilis* (MOBS). The growth promoter used was halquinol (mixture of 5,7-dichloro-8-quinolinol, 5-chloro-8-quinolinol, and 7-chloro-8-quinolinol). Animals in groups PCO, MO, BS and MOBS were orally challenged with ETEC K88+. To ensure that the animals would begin the study free of ETEC activity, fecal swabs were obtained and cultured before starting the study. The 5-wk experiment included a pre-starter period (1 wk), a starter I period (2 wk) and starter II period (2 wk). Experimental diets were formulated based on corn, soybean meal and complex base mix (Table 1). All diets either met or exceeded the nutrient requirements suggested by NRC (1998). Animals were allowed ad libitum access to feed and water.

2.2. Performance and Collection Procedures

An initial BW was taken at d 0 with subsequent BW and food intake obtained on d 21 and 35. BW and feed intake were used to determine ADG, ADFI and F:G. The fecal scoring was classified by using a scale ranking from 0 to 3, with 0 = normally shaped feces, 1 = shapeless feces, 2 = soft feces, and 3 = liquid feces. On d 5, animals were inoculated by oral gavage with 10 ml of ETEC (1×10^9 cfu/ml), except the NCO group, which was inoculated with 10 ml of 0.9% saline solution on 21 d, after 12 hours fasting of solid, one animal per experimental unit was selected according to the average weight of the pen and

slaughtered for determination of all of the other parameters under study. Length and empty weight of the small intestine was recorded. Fragments were taken for histology from the duodenum, jejunum and ileum, and transferred to 10% neutral buffered formaldehyde. The pH of the intestinal content was determined inside the cecum and colon, and 20 ml of digest collected to carry out the extraction of SCFA and lactic acid. 10 cm segments of the duodenum, jejunum, ileum and cecum were obtained from cross-sections of the mesenteric border. The material was sealed at its ends, stored in sterile plastic bags and taken to microbiological count for ETEC K88+, total *E. coli*, *Salmonella* sp and *Lactobacillus* sp. Blood was collected by jugular puncture and mucus by ileum scraping for quantification of immunoglobulin.

2.3. Analytical Methods

2.3.1. Histological Analysis

Two segments of 2 cm were collected from the duodenum, jejunum and ileum by cross cuts. The samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. Slides were processed by hematoxylin-eosin technique. For each sample, crypt depth and villus height and width were measured. All measurements were made on 30 villi and 30 crypts per sample, using the Olympus DP 11 digital camera attached to a binocular microscope. The images were digitized and analyzed in the Cell B Program (Imaging for Life Science Microscopy Software, Olympus). Villus height was represented by the distance

from the opening of the crypt to the top of the villus. The crypt depth was measured from the base of the crypt at the opening of the crypt. The ratio of villus height: crypt depth was calculated.

2.3.2. Analysis of SCFA

The material was carefully collected and treated with phosphoric acid (50%) at the ratio of 0.5 ml of phosphoric acid: 10 ml of contents, homogenized and frozen at the temperature of -20 °C until analysis. Analysis of SCFA and lactic acid were performed by gas liquid chromatography using the method of Cochrane (1975).

2.3.3. Immunoglobulins

The concentration of IgA in the ileum, IgG and IgM in serum was quantified using the pig IgA, IgG and IgM ELISA Quantitation Kits (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX). For determination of IgG and IgM, 10 ml of blood were collected into nonheparinized test tubes. The blood was allowed to clot at room temperature and then subjected to centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min to obtain serum. For quantification of IgA, 2 ml of mucus were collected from the intestinal wall of the ileum.

2.4. Statistical Analysis

The data were subjected to the analysis of variance after normality test (Shapiro-Wilk). Means were compared by Student Newman Keuls (SNK) test at 5% of significance. For SCFA and morphometrics characteristics, the option of

least squares means transformation was used to obtain normality. For microbiological variables, means were compared by Kruskal-Wallis at 5%. All statistical analyses were performed using the SAS Inst. Inc., Cary, NC (1996). For performance analyses, the pen was used as the experimental unit using initial BW; a randomized blocks design was followed. For other data, the pig was the experimental unit.

3. Results

3.1. Growth Performance

The performance characteristics were not influenced by the treatments ($P>0.05$). Results for BW, ADG, ADFI and F:G are shown in Table 2.

3.2. Fecal Consistency

No cases of diarrhea or soft feces were observed during the 5 weeks' experiment. Thus, the assessment of fecal consistency was disregarded in this study.

3.3. Immunology and Microbiology

Bacterial counts of *Lactobacillus* sp., total *E.coli*, ETEC and *Salmonella* sp. in the duodenum, jejunum, ileum and cecum digesta did not differ among the treatments ($P>0.05$), except for the total population of *E. coli*, which was lower in the ileum of the NCO group, as the data in Table 3 show. In terms of immune function, serum concentrations of IgG and IgM, and also the

ileal IgA concentrations were not influenced by the diet (data not shown; 243 ± 25 ng/ml, 223.18 ± 38.6 ng/ml and 680 ± 45 ng/ml, IgA, IgG and IgM, respectively).

3.4. SCFA and pH

The use of additives, singly (MO or BS diets), showed lower production of propionic acid in the cecum of piglets ($P < 0.05$), despite showing concentration ($P < 0.05$) similar to the group with growth promoter PCO and the combined diet (MOBS). The concentration of propionic acid in the colon was similar among the treatments ($P > 0.05$). The concentrations of acetic, butyric and lactic acids also showed no significant differences among the diets ($P > 0.05$) as shown in Table 4. The pH of digesta was not affected by the experimental diets in any of the sections of the large intestine (data not shown; 6.16 ± 0.13 and 6.21 ± 0.11 for colon and cecum, respectively).

3.5. Intestinal Length and Weight

The addition of the antibiotic substitutes in diets provided greater length of small intestine ($P < 0.05$) in the animals, while the PCO group had the shortest length ($P < 0.05$). With respect to intestinal weight, despite the MOBS and NCO diets provided greater relative weight of small intestine ($P < 0.05$), the POC and BS groups also had similar values, as shown in Table 5.

3.6. Intestinal Histology

Histological parameters were not affected by the diets in the duodenum

and jejunum ($P>0.05$). In turn, there were significant differences in the ileal morphology ($P<0.05$). Animals in the PCO group showed greater villus:crypt ratio, and also higher villi, but presented villus length similar to the piglets supplemented with MOS (MO and MOBS diets). The villi of the ileum were still affected by the BS diet, with lower height ($P<0.05$) when compared to other treatments. The results of the histological analysis are also presented in Table 5.

4. Discussion

4.1. Growth Performance

Growth performance was not affected by dietary treatment during the whole period of study, showing that the use of MOS and *B. subtilis*, either pure or combined (BS, MO and MOBS), in the diets of piglets in initial phase of development give equal ADG, ADFI and F:G when compared to animals fed a growth promoter (NCO and POC), without providing either additional gains or losses. Similar results were found by Bhandari et al. (2008), which investigated the effects of *B. subtilis* direct-fed microbial on *E. coli* induced scouring in pigs. Gebru et al. (2010) also found that diets supplemented with the probiotic *L. plantarum* promote equal benefits to diets containing antibiotics, in terms of growth performance in growing pigs experimentally challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium.

While Choi et al. (2011) noticed the efficacy of probiotic diets, studying multi-microbe probiotics (*L. acidophilus*, *B. subtilis*, *Aspergillus oryzae* and

Saccharomyces cerevisiae) by the improvement of the growth performance in weaned pigs, with better ADG, ADFI and G:F, when compared with pigs fed negative control diet. But, this did not include evaluation of experimentally infected animals.

Alexopoulos et al. (2004) demonstrated performance benefits with *B. Subtilis* and *B. licheniformis* spores as probiotics for sows and neonatal piglets, but experimental infection of animals with *E. coli* was not evaluated. However, in vitro studies indicated that *Bacillus* can produce antimicrobial to pathogenic compounds. Similarly, Kiers et al. (2003) observed that weaned pigs challenged with enterotoxigenic *E. coli* had ADG 18 and 21% greater when fed soybean meal fermented by *Rhizopus* and *Bacillus*, respectively, for 4 weeks post-challenge.

By analyzing data from 54 experiments, Miguel et al. (2004) found increases of 4.12% in weight gain, 2.11% in feed intake and 2.29% in feed efficiency of nursery pigs fed diets containing MOS compared to control groups.

Kiarie et al. (2011) evaluated the effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in 90 weanling pigs orally challenged with *Escherichia coli* K88+ and verified better performance, especially in the presence of the active enteric disease.

However, few studies have evaluated *Bacillus* spp. and manan - oligosaccharides as a growth promoter in *E. coli* K88+ postweaning diarrhea.

4.2. Fecal Consistency

It has been well recognized that infection with enterotoxigenic *E. coli* harbouring the F4 fimbriae (ETEC K88+) is one of the most important causes of postweaning diarrhea in pigs. This pathotype is characterized by the expression of an F4 fimbrial adhesin which induces bacterial attachment to specific F4 receptors located in the brush border of the swine intestine and secretion of enterotoxins that cause diarrhea (Fairbrother et al., 2005).

Recent studies have demonstrated the suitability of an ETEC K88+ challenge model in evaluating the role of feed additives in nursery pig diets (Trevisi et al. 2009; Kiarie et al., 2011; Liu et al. 2010; Zanello, 2011), however the current study did not present incidence of liquid or soft feces in weaned pigs upon oral challenge with ETEC K88+, assuming that the inoculation was not effective in promoting an enteric infection. What supports this statement is the absence of an acute immune response and clinical signs of colibacillosis, such as diarrhea, dehydration, weight loss, weakness and anorexia in those animals inoculated with this strain (PCO, MO, BS and MOBS groups).

A reason for this fact would be the dose of inoculum used (1×10^9 cfu/ml), considering that Bandharim et al. (2008), utilizing weanling pigs challenged with ETEC K88+ (6.3×10^9 cfu/ml), verified that the level of disease induced by the infection model occurred within the 24 to 48 h after inoculation. Owusu-Asiedu et al. (2003) noticed that scours was evident in all pigs 8 h after

challenge, with dose of 10^{10} cfu/mL of ETEC K88+.

Another and the main explanation is the fact that all experimental diets were formulated with zinc oxide (ZnO), with concentrations ranging from 2,564 to 3,846 mg/kg. Studies have reported that ZnO at pharmacological concentrations (2,000 to 3,000 mg/kg) could reduce diarrhea during weaning (Holm, 1990; Kavanagh, 1992), not showing, clearly, the effect of the inoculation with ETEC K88+ on the occurrence of diarrhea. It was suggested that Zn ions block the oxidase system of the respiratory chain of *E. coli* (Kasahara & Anraku 1972), inhibiting their growth in the intestine of piglets, although its mode of action is not entirely clear yet.

4.3. Immunology

The intestine represents a critical interface between the animal and the residing microorganisms. An animal that is challenged by an infectious agent will divert nutrients away from growth and development to defense processes (Cook, 2010). However, there is the hypothesis that improved immunity (i.e., phagocytosis, antibody, cytokines and chemokines production) by using specific dietetics nutrients would improve animal health and efficiency of production. In this context, both pre- and pro-biotics have been useful as important tools to stimulate the immune system (Cook, 2010).

The present study did not show effect of diets upon challenge by ETEC K88+ on the levels of serum immunoglobulins (IgM and IgG) and mucus-ileal

(IgA) in animals subjected to different treatments; which contradicts some results already reported in the literature who attest the animal immune system modulation through the use of prebiotics and probiotics.

Davis et al (2004) found an alteration in leukocyte populations in pigs fed MOS. Swanson et al. (2002), verified the highest serum concentration of IgG and IgA, and IgA in the ileal digesta of dogs fed MOS and fructoligosaccharides. Kudoh et al. 1999 showed an increase in fecal IgA concentrations in rats supplemented with MOS. Sohn et al. (2000) also verified the modulation of specific and nonspecific immune responses in pigs fed MOS, with gains in performance characteristics.

Probiotics improve the health status of growing and finishing pigs (Alexopoulos et al., 2004), and the intestinal immune system of young pigs (Scharek et al., 2007; Szabo et al., 2009). Similarly, soybean meal fermented with probiotic bacteria also increases the immune response of growing-finishing pigs (Hung et al., 2008).

Bhandari et al. (2008) noticed that by 14 d postinfection with ETEC K88+ the animals were fully recovered. In our study, collecting material for evaluating the immune parameters occurred 16 d after infection, which may partly explain the difference between our results and previous studies, given the fact that acute response to a infection is noticed up to 96 h after challenge, with lifetime for IgM of 6 d and for IgA 10 d (Janeway Jr. et al., 2005). In dealing

with post-infectious immunity, we found no significant difference between the concentrations of IgG in serum, since total antibodies and not specific immunoglobulins for ETEC K88+ were evaluated.

4.4. Microbial Ecosystem

Mannan-oligosaccharides have been proposed to promote growth by modifying the gastrointestinal ecosystem and reducing intestinal pathogen colonization (Spring, 2000). White et al. (2002) found a lower concentration of coliforms in the feces of pigs fed diets containing MOS, and Castillo et al. (2008) reported that the use of MOS reduced the number of enterobacteria in the jejunum of piglets weaned at ± 20 d.

The mode of action of a probiotic also may include modulation of microbiota and changes in the structure and function of intestinal epithelium (Stein & Kil, 2006; Boirivant & Strober, 2007). Choi et al. (2011), verified that the feeding of 0.60% probiotic diet improved *Lactobacillus* population in the feces and intestine and reduced the population of *Clostridium* and coliforms in feces and ileum in weaned piglets.

In this study, the probiotic diet (BS), prebiotic diet (MO) or their combination (MOBS) proved be as effective as the use of the antibiotic (PCO and NCO) in maintaining the balance of intestinal flora, but not stimulated the growth of *Lactobacillus* sp or inhibited the development of *E. coli*. However, smallest population of total *E. coli* was found in the ileum of animals not

challenged, that being an indication that inoculation with ETEC K88+ was effective.

No change in bacterial populations was clearly reflected by the fermentation patterns which were not altered by the experimental diets, as pH of digesta and production of SCFA and lactic acid. Except for the prebiotic or probiotic supplementation (MO or BS) which interfered negatively on the production of propionic acid in the cecum; which may be explained by the particular mode of action of *B. subtilis* which differs from other probiotic strains. They do not colonize the gastrointestinal tract (Kornegay et al., 1996), reducing their intestinal levels by 24 hours (Sanders et al., 2003), suggesting that they may affect the production of propionic acid due to its fast rate of passage in the gut or even for the dosage used not having been enough to stimulate this fermentation.

Similarly, MOS has a unique mechanism of action in the selection of the microbiota when compared to most of the oligosaccharides used as prebiotics. They act as ligands with high affinity, providing a competitive agglutination for certain types of specific gram-negative bacteria through its interaction with mannose-sensitive lectins on the surface of these bacteria (SPRING et al., 2000). Thus, they act as adsorbents of pathogens and not as a substrate for lactic acid bacteria. This fact, coupled with its low rate of inclusion in the diet, relative to other non-digestible carbohydrates as resistant starch, non-starch

polysaccharides of cereals or non-digestible oligosaccharides of soybeans, will likely interfere in their potential to promote different patterns of fermentation (Castillo et al., 2008). However, MOS does not always change the pH or SCFA profile in the gut of weanling pigs (White et al., 2002; Castillo et al., 2008).

This reduction in propionate production may still be explained by the preferential use of the acrylate pathway for the obtaining of propionate from lactate, when in contact with such additives. This is an alternative route to the succinate pathway and acetyl CoA-dependent, one of the byproducts of butyrate and acetate, which demands more time for its formation.

4.5 Intestinal Morphology

The growth promoter in animals challenged (PCO), presented higher villus:crypt ratio in the ileum, promoted by major development of the villi. This shows that in situations of bacterial challenge, the antibiotic was superior to other additives to ensure the integrity of the intestinal epithelium, stimulating villus tropism. However, the use of MOS, pure or associated (MOBS and MO diets) resulted in villi height similar to the PCO group.

An increase in villus height and villus:crypt ratio in the jejunum has been reported in weaned pigs fed antibiotics and yeast culture when compared with pigs fed the control diet (Shen et al., 2009). Castillo et al. (2008) evaluating the use of 0.2% MOS in diets for weanling pigs, showed that the villus height:crypt depth ratio in the ileum was higher in MOS-fed pigs due to a

significant increase in villous height.

The same study also showed no histological differences in the duodenum and jejunum of animals compared to animals fed a diet containing zinc in organic form or control diet, without adding any promoter growth. This beneficial effect of MOS on ileal morphology could be due to an increased production of mucus produced by goblet cells present in the intestinal villi, forming a gel layer which protects the epithelium, as proposed by Ferket (2002).

The use of *B. subtilis* resulted in lower villi height in the ileum of pigs fed BS diet (figure 1). These data disagree with Choi et al. (2011), who noticed that multi-microbe probiotics (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*) had greater villus height in the jejunum and ileum and had increased villus height: crypt depth in the ileum.

The current result can be related to low production of propionate in the cecum of these animals, not providing sufficient energy to promote a hypertrophy of the ileal mucosa, considering that gut cells are supported by the SCFA derived from bacterial fermentation, providing more than 70% of the oxygen consumed by this tissue (Swanson & Fahey, 2006) This caloric intake in pigs has been estimated between 5 to 28% of the maintenance energy requirements, depending on the frequency of consumption and level of fiber in the diet (NRC, 1998).

However, in terms of intestinal length, the use of additives (BS, MO and

MOBS diets) promoted higher measures and the PCO group lower, which demonstrates the possible action of *B. subtilis* and MOS on the allometric development of the gastrointestinal tract. BS diet was one of those which most provided gains in length of the small intestine, suggesting that there is a compensatory growth in length of the intestinal tract, when there is a deletion in the development of the villi. Some authors speculated that this 'gut elongation' is allowed for more efficient nutrient absorption (Cook, 2010).

5. Conclusions

The prebiotic and probiotic supplementation was so effective as using a growth promoter in weanling pigs challenged with *E. coli* K88+ on features performance, immune function, microbiological gut and intestinal ph.

However, diets supplemented with prebiotic or probiotic, and combination of both, changed the morphology of the small intestine of the piglets.

Data in the literature on intestinal allometry associated with the use of probiotics and prebiotics are rare or nonexistent. Showing the real need to conducted futures studies to better understand their mode of action.

Acknowledgments

This study was made possible by a support of FATEC Co., Inc., Arujá, SP (Brazil).

References

- Alexander, T. J. L. 1994. Neonatal diarrhea in pigs. In: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans (Gyles, C.L., Ed.). 151–170. CAB International, Wallingford.
- Alexopoulos, C.; Georgoulakis, I. E.; Tzivara, A.; Kritas, S. K.; Siochu, A.; Kyriakis, S. C. 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88, 381–392.
- Bhandari, S. K., Xu, B., Nyachoti, C. M., Giesting, D. W., Krause, D. O. 2008. Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhea: Effects on gut microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 86, 836–847.
- Boirivant, M., Strober, W. 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23, 6, 679-692.
- Budiño, F. E. L., Thomaz, M. C., Kronka, R. N., Tucci, F. M., Fraga, A. L., Scandolera, J. A., Robles-Haynate, R. A., Nadai, A., Correia, R. C. 2006. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarréia e contagem de coliformes totais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 43, 59-67.

- Campbell, J. M., Fahey, G. C., Wolf, B.W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* 127, 130-136.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Taylor-Pickard, J. A., Pérez, J. F., Gasa J. 2008. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *J. Anim. Sci.* 86, 94–101.
- Che T. M., Johnson, R. W., Kelley, K. W., Van Alstine, W. G., Dawson, K. A., Moran C. A., Pettigrew, J. E. 2011. Mannan oligosaccharide improves immune responses and growth efficiency of nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J ANIM SCI* May 27, 2011 [jas.2010-3366](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3366); published ahead of print May 27, 2011, doi:10.2527/jas.2010-3366.
- Choi, J. Y., Kim, J. S., Ingale, S. L., Kim, K. H, Shinde, P. L., Kwon, I. K., Chae, B. J. 2011. Effect of potential multi-microbe probiotic product processed by high drying temperature and antibiotic on performance of weanling pigs. *J Anim Sci*, 89 (6), 1795-804.
- Cochrane, G. C. 1975. A review of the analysis of free fatty acids. *Journal of Chromatographic Science*, Niles. 13, 9, 440-447.

- Cook M. E. 2011. Triennial growth symposium: A review of science leading to host-targeted antibody strategies for preventing growth depression due to microbial colonization. *J. Anim. Sci.* 89, 1981–1990.
- Davis, B. L., Fraser, J. N., Burkey, T. E., Skjolaas, K. A., Dritz S. S., Johnson B. J., Minton J. E. 2010. Oral inoculation with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium or *Choleraesuis* promotes divergent responses in the somatotrophic growth axis of swine. *J. Anim. Sci.* 88, 1642–1648.
- Davis, M. E., Brown, D. C., Maxwell, C. V., Johnson, Z. B., Kegley, E. B., Dvorak, R. A. 2004. Effect of phosphorylated mannans and pharmacological additions of zinc oxide on growth and immunocompetence of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 581–587.
- Davis, M. E., Parrott, T., Brown, D. C., Rodas, B. Z., Johnson, Z. B., Maxwell, C. V., Rehberger, T. 2008. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 86, 1459–1467.
- Fairbrother, J. M., Nadeau, E., Gyles, C. L. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev.* 6, 1, 17-39.
- Feng, J., Liu, X., Xu, Z. R., Lu, Y. P., Liu, Y. Y. 2007. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1845–1850.

- Ferket, P. R. 2002. Use of oligosaccharides and gut modifiers as replacements for dietary antibiotics. Pages 169–182 in Proc. 63rd Minnesota Nutr. Conf., Eagan, MN.
- Forshell, L. P., Wierup, M. 2006. Salmonella contamination: A significant challenge to the global marketing of animal food products. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 25, 541–554.
- Gebru, E., Lee, J. S., Son, J. C., Yang, S. Y., Shin, S. A., Kim, B., Kim, M. K., Park, S. C. 2010. Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. J. Anim. Sci.. 88, 3880–3886.
- Hampson, D. J. 1994. Postweaning *Escherichia coli* diarrhea in pigs. In: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans (Gyles, C.L., Ed.). 629–647. CAB International, Wallingford.
- Holm, A. *E. coli* associated diarrhoea in weaner pigs: zinkoxide added to the feed as a preventive measure? 1990. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 11., Lausanne, Switzerland. Proceedings... Switzerland: IPVS, p.154.

- Hung, A. T. Y., Su, T. M., Liao, C. W., Lu, J. J. 2008. Effect of probiotic combination fermented soybean meal on growth performance, lipid metabolism and immunological response of growing-finishing pigs. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 3, 431–436.
- Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomik, M. J. 2005. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6th ed. New York: Garland Science.
- Kasahara, M., Ankaru, Y. 1972. Inhibition of the respiratory chain of *Escherichia coli* by zinc ions. *Journal of Biochemistry, Tokyo*. 72, 3, 777-781.
- Kavanagh, N. T. The effect of feed supplemented with zinc oxide on the performance on recently pigs. 1992. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., The Hague, Netherlands. Proceedings... Netherlands: IPVS, p. 616.
- Kiarie, E., Slominski, B. A., Krause, D. O., Nyachoti, C. M. 2008. Nonstarch polysaccharide hydrolysis products of soybean and canola meal protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets. *J. Nutr.* 138, 502–508.
- Kiarie, E., Bhandari, S., Scott, M., Krause, D. O., Nyachoti, C. M. 2011. Growth performance and gastrointestinal microbial ecology responses of piglets receiving *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products after an oral challenge with *Escherichia coli* (K88). *J anim sci.* 89, 1062-1078.

- Kiers, J. L., Meijer, J. C., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Nabuurs, M. J. A., Van Der Meulen, J. 2003. Effect of fermented soy beans on diarrhea and feed efficiency in weaned piglets. *J. Appl. Microbiol.* 95, 545-552.
- Kornegay E.T., Risley, R. C. 1996. Nutrient digestibilities of a corn-soybean meal diet as influenced by *Bacillus* products fed to finishing swine. *J. Anim. Sci.* 74, 799-805.
- Kritas, S. K., Morrison, R. B. 2003. A critical review of feeding probiotics to pigs. p. 252–255 in Proc. A. D. Leman Swine Conf., Saint Paul, MN. Univ. Minnesota, St. Paul.
- Kudoh, K., Shimizu, J., Ishiyama, A., Wada, M., Takita, T., Kanke, Y., Innami, S. 1999. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology.* 45, 173–181.
- Liu, P., Piao, X. S., Thacker, P. A., Zeng, Z. K., Li, P. F., Wang, D., Kim, S. W. 2010. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 88, 3871–3879.
- Liu, X., Feng, J., Xu, Z., Lu, Y., Liu, Y. 2007. The effects of fermented soybean meal on growth performance and immune characteristics in weaned piglets. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31, 341–345.

- Miguel, J. C., Rodriguez-Zas, S. L., Pettigrew, J. E. 2004. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. *Journal of Swine Health and Production*, 12, 296-307.
- NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ojha, S., Kostrzynska, M. 2007. Approaches for reducing Salmonella in pork production. *J. Food Prot.* 70, 2676–2694.
- Owusu-Asiedu, A., Nyachoti, C. M., Marquardt, R. R. 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *J Anim Sci.* 81, 1790-1798
- Price, K. L., Totty, H. R., Lee, H. B., Utt, M. D., Fitzner, G. E., Yoon, I., Ponder, M. A. 2010. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during Salmonella infection. *J. Anim. Sci.* 88, 3896–3908.
- Rapacz, J., Hasler-Rapacz, J. 1986. Polymorphism and inheritance of swine small intestinal receptors mediating adhesion of three serological variants of *Escherichia coli*-producing K88 pilus antigen. *Anim. Genet.* 17, 305–321.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., McCormick, J. K. 2003. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 658-672.

- Sanders, M. E., Morelli, L., Tompkins, T. A., 2003. Sporeforms as human probiotics *Bacillus*, *Sporolacotbacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Chicago, US. 2, 101-110.
- Scharek, L., Guth, J., Filter, M., Schimdt, M. F. G. 2007. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. *Archives of Animal Nutrition*. 61, 223–234.
- Setia, A., Bhandari, S. K., House, J. D., Nyachoti, C. M., Krause, D. O. 2009. Development and in vitro evaluation of an *Escherichia coli* probiotic able to inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 87, 2005–2012.
- Shen Y. B., Piao X. S., Kim S. W., Wang L., Liu P., Yoon I., Zhen Y. G. 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 87, 2614–2624.
- Sohn, K. S., Kim, M. K., Kim, J. D.; Han, I. K. 2000. The role of immuno stimulants in monogastric animal and fish – Review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, Suweon, 13, 8, 1178-1187.

- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K. A., Newman, K. E. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79, 205-211.
- Stein, H. H., Kil, D. Y. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: Dietary tools, part 2. *Anim. Biotechnol.* 17, 217–231
- Swanson, K. S., Fahey Jr., G. C. 2006. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. In: *Recent Advances in Pet Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, p.19-35.
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Healy, K. A., Dawson, K. A., Merchen, N. R., Fahey Jr, G. C. 2002. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannan oligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial population in adult dogs. *Arch. Anim. Nutr.* 56, 309-318.
- Szabo, I., Wieler, L. H., Tedin, K., Scharek-Tedin, L., Taras, D., Hensel, A., Appel, B., Nockler, K. 2009. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. *Applied and Environmental Microbiology.* 75, 2621–2628.

- Trevisi, P., Melchior, D., Mazzoni, M., Casini, L., De Filippi, S., Minieri, L., Lalatta-Costerbosa, G. Bosi, P. 2009. A tryptophan-enriched diet improves feed intake and growth performance of susceptible weanling pigs orally challenged with *Escherichia coli* K88.
- Waters, J. R., Sellwood, R. 1982. Aspects of genetic resistance to K88 E. coli in pigs. The 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Madrid, p. 362.
- White, L. A., M. C. Newman, G. L. Cromwell, and M. D. Lindemann. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 80, 2619–2628.
- Yokoyama, H., Peralta, R. C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y., Kodama, Y. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60, 998–1007.
- Zanello, G., Meurens, F., Berri, M., Chevalere, C., Melo, S., Auclair E., Salmon, H. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* decreases inflammatory responses induced by F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in porcine intestinal epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 141, 133-138.

Table 1. Composition of pre-starter and starter control diets, as-fed basis.

Ingredient, %	Diets		
	Pre-starter (1 wk)	Starter I (2-3 wk)	Starter II (4-5 wk)
Corn	50	55	60
Soybean meal	10	15	20
Pre-Initial base mix ^{0,1}	40	0	0
Initial base mix I ^{0,2}	0	30	0
Initial base mix II ^{0,3}	0	0	20
Total	100	100	100
Calculated chemical composition			
ME, kcal/kg	3,246	3,371	3,353
CP, %	19.79	19.50	19.55
Calcium, %	0.82	0.82	0.73
Total phosphorus, %	0.64	0.65	0.63
Lysine, %	1.49	1.40	1.28
Methionine, %	0.54	0.50	0.46
Methionine + Cystine, %	0.85	0.80	0.82
Threonine, %	0.95	0.90	0.82
Tryptophan, %	0.27	0.24	0.24

⁰Composition: Calcium carbonate, sodium bicarbonate, dicalcium phosphate, whole milk powder, whey powder, micronized soybean meal, sodium chloride, pre-gelatinized maize, dry yeast brewery, plasma powder, amino acid mineral and vitamin premix.

¹Pre-initial base mix – Levels per kg of product: A vitamin (21.00 IU), B1 vitamin (3.68 mg), B2 vitamin (9.6 mg), B6 vitamin (3.28 mg), D3 vitamin (4.20 IU), E vitamin (127.50 mg), K3 vitamin (5.50 mg), pantothenic acid (31.50 mg), folic acid (0.95mg), biotin (0.08 mg), antioxidant (750.00 mg), Fe (252.00 mg), Cu (600.00 mg), Mn (116.25 mg), zinc oxide (3,846.00 mg), Co (0.80 mg), Se (0.88 mg), I (1.26 mg), niacin, (75,00mg), xylanase (3,324.00 mg) betaglucanase (4,025.00 mg), saccharin sodium (656.00 mg), phosphoric acid (4100.00 mg), citric acid (262.00 mg), malic acid (15.00 mg), lactic acid (12.00 mg) and tartaric acid (7.50 mg).

²Initial base mixe I - Levels per kg of product: antioxidant (567.00 mg), vitamin B6 (4.10 mcg), A Vitamin (27,000.00 IU), B1 Vitamin (4.60 mg), B2 vitamin (80.00 mg), D3 vitamin (5.400 IU), E vitamin (170,00 mg), K3 vitamin (7 mg), B12 vitamin (80.00 mg), pantothenic acid (42.30 mg), folic acid (0.95 mg), biotin (0.10 mg), choline (2,019.506 mg), Cu (800 mg), Mn (155.00 mg), zinc oxide (3,846.00 mg), Co (1.00 mg), Se (0.88 mg), I (1.05 mg), niacin (75.00mg), xylanase (4,430.00 mg) betaglucanase (5,370.00 mg), citric acid (350.00 mg),

malic acid (20.00 mg), lactic acid (16.00 mg), tartaric acid (10.00 mg), niacin (100.00 mg) , biotin (0.10 mg), Fe (336.00 mg), Mn (155.00 mg), Sodium Saccharin (750.00 mg) and phosphoric acid (5,470.00)

³Initial base mixe II - Levels per kg of product: antioxidant (1,000 mg), B6 vitamin (6.560 mg), A Vitamin (20.500 IU), B1 Vitamin (7.360 mg), B2 vitamin (18.40 mg), D3 vitamin (4.10 IU), E vitamin (255.00 mg), vitamin K3 (10.50 mg), vitamin B12 (120 mg), pantothenic acid (63.000 mg), folic acid (1.90 mg), biotin (0.160 mg), choline (2,274.245 mg), Cu (1,200 mg), Mn (232.50 mg), zinc oxide (2,564 mg), Co (1.60 mg), Se (1.32 mg), I (1.89 mg), niacin (75.00mg), xylanase (43,324.00 mg) betaglucanase (4,025.00 mg), citric acid (262.00 mg), malic acid (15.00 mg), lactic acid (12.00 mg), tartaric acid (7.50 mg), Fe (504.00 mg), Sodium Saccharin (656.00 mg) and phosphoric acid (4,100)

Table 2. Growth performance of piglets at 21-d and 35-d postweaning supplemented with halquinol, prebiotic and probiotic¹.

	NCO	PCO	MO	BS	MOBS	CV (%)	P =
<i>d 21</i>							
ADG, g	434	402	383	442	393	16.50	0.59
ADFI, g	738	692	652	698	702	8.39	0.29
F:G	1.71	1.74	1.75	1.66	1.80	11.09	0.54
<i>d 35</i>							
ADG, g	525	536	516	532	507	10.32	0.91
ADFI, g	921	912	896	907	902	6.98	0.97
F:G	1.75	1.71	1.75	1.71	1.78	4.86	0.61

ADG = average daily gain; ADFI = average daily feed intake; F:G = feed conversion

¹ No significant differences ($P > 0.05$)

Diets: NCO = (negative control diet) halquinol, 200 mg/kg; PCO = (positive control diet) antibiotic, 200 mg/kg + challenge; MO = mannan-oligosaccharides, 1,500 mg/kg + challenge; BS = *B. subtilis*, 5×10^8 cfu/kg + challenge; MOBS = both additives + challenge

Table 3. Bacterial populations of lactobacilli and enterobacteria in the duodenum, jejunum, ileum and cecum (cfu/g), in pigs at 21 d postweaning supplemented with halquinol, prebiotic and probiotic^{1,2}.

	NCO	PCO	MO	BS	MOBS	P =
<i>Lactobacillus</i> sp						
Duodenum	2.74	1.49	1.60	2.98	2.43	0.28
Jejunum	2.60	2.50	1.65	3.13	3.85	0.13
Íleum	2.08	1.59	1.81	1.63	2.46	0.60
Cecum	3.41	2.40	2.06	4.34	2.67	0.33
<i>Salmonella</i> sp						
Duodenum	1.79	<1.0	3.88	2.15	2.15	0.24
Jejunum	1.17	<1.0	3.00	1.00	<1.0	0.09
Íleum	1.87	1.48	4.15	<1.0	<1.0	0.43
Cecum	2.08	1.70	4.15	<1.0	<1.0	0.26
<i>E. coli</i> ETEC K88+						
Duodenum	2.98	4.40	3.37	3.61	4.61	0.54
Jejunum	2.04	3.86	3.21	1.96	2.93	0.26
Íleum	3.15	4.67	3.91	3.23	3.95	0.56
Cecum	2.76	4.59	3.03	3.91	4.15	0.67
Total <i>E. coli</i>						
Duodenum	4.14	4.79	4.50	4.53	5.18	0.80
Jejunum	2.59	4.48	4.42	2.51	4.05	0.16
Íleum	2.49 b	4.38 a	5.94 a	4.46 a	4.50 a	0.04
Cecum	3.35	4.41	3.54	4.46	4.56	0.77

^{a, b}Within a row, means lacking a common letter differ by Kruskal-Walis Test (P < 0.05).

¹Diets: NCO = (negative control diet) halquinol, 200 mg/kg; PCO = (positive control diet) antibiotic, 200 mg/kg + challenge; MO = mannan-oligosaccharides, 1,500 mg/kg + challenge; BS = *B. subtilis*, 5×10^8 cfu/kg + challenge; MOBS = both additivies + challenge

²The bacterial counts were log transformed and expressed as log₁₀ cfu/g.

Table 4. Concentration (mM) of SCFA and lactic acid in pigs at 21-d postweaning, supplemented with halquinol, prebiotic and probiotic¹.

	NCO	PCO	MO	BS	MOBS	CV (%)	P =
<i>Cecum</i>							
Latic ac.	5.30	5.83	5.50	5.18	6.09	8.55	0.63
Acetic ac.	88.15	90.16	72.22	78.07	90.05	13.88	0.65
Propionic ac. ¹	26.11 ab	35.89 a	19.89 b	19.64 b	26.95 ab	14.46	0.02
Butiric ac.	27.25	26.73	30.73	25.53	41.08	19.34	0.41
Total	146.80	176.60	128.30	128.40	164.20	10.81	0.11
<i>Colon</i>							
Latic ac.	4.52	6.19	5.12	6.26	5.73	11.16	0.15
Acetic ac.	81.03	99.07	83.73	95.63	86.41	11.22	0.57
Propionic ac.	23.82	30.58	27.63	24.95	26.98	11.30	0.52
Butiric ac.	32.18	38.82	32.67	49.83	51.06	20.12	0.18
Total	141.50	174.70	164.90	176.70	170.20	9.79	0.44

^{a-b}Least squares means within a row lacking a common letter differ by SNK Test (P < 0.05).

¹Diets: NCO = (negative control diet) halquinol, 200 mg/kg; PCO = (positive control diet) antibiotic, 200 mg/kg + challenge; MO = mannan-oligosaccharides, 1,500 mg/kg + challenge; BS = *B. subtilis*, 5×10^8 cfu/kg + challenge; MOBS = both additives + challenge

Table 5. Histological parameters, length and relative weight (RW) of small intestine of pigs at 21-d postweaning supplemented with halquinol, prebiotic and probiotic¹.

	NCO	PCO	MO	BS	MOBS	CV (%)	P =
<i>Small intestine</i>							
Length, cm	8.63 b	7.59 c	9.92 a	10.12 a	10.28 a	7.04	<0.00
RW, % LW	4.26 a	3.65 ab	3.18 b	3.86 ab	4.31 a	15.08	0.04
<i>Duodenum</i>							
Crypt depth, μm	331	355	300	299	360	7.56	0.17
Villus height, μm	399	350	400	325	334	7.15	0.09
Width of villus, μm	224	267	261	236	206	13.33	0.51
Villus:crypt ratio	1.21	1.00	1.35	1.11	0.94	9.99	0.06
<i>Jejunum</i>							
Crypt depth, μm	252	261	267	224	309	9.53	0.14
Villus height, μm	319	319	280	283	341	5.93	0.08
Width of villus, μm	271	258	191	294	301	20.42	0.46
Villus:crypt ratio	1.30	1.27	1.07	1.32	1.10	11.82	0.56
<i>Íleum</i>							
Crypt depth, μm	250	202	230	185	275	10.39	0.06
Villus height, μm	271 b	335 a	307 ab	202 c	303 ab	5.77	0.00
Width of villus, μm	249	225	175	150	277	12.87	0.06
Villus:crypt ratio ¹	1.10 b	1.65 a	1.34 b	1.12 b	1.16 b	8.34	0.00

^{a, b, c}Least squares means within a row lacking a common letter differ by SNK Test (P < 0.05).

¹Diets: NCO = (negative control diet) halquinol, 200 mg/kg; PCO = (positive control diet) antibiotic, 200 mg/kg + challenge; MO = mannan-oligosaccharides, 1,500 mg/kg + challenge; BS = *B. subtilis*, 5×10^8 cfu/kg + challenge; MOBS = both additives + challenge

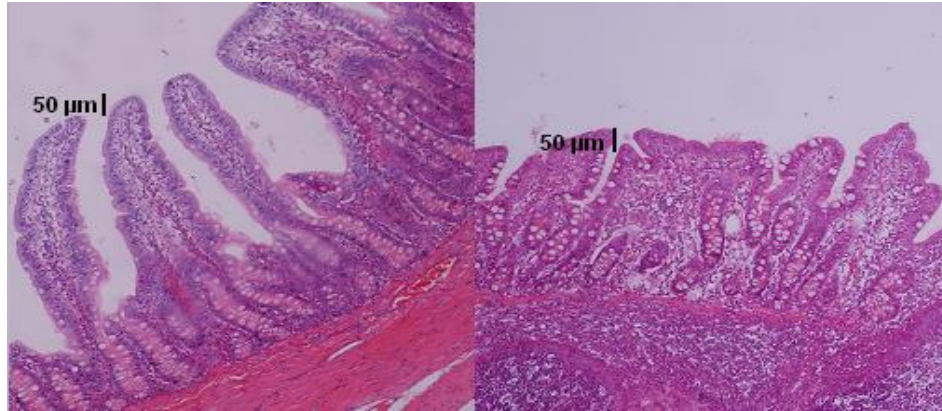


Figure 1. Appearance of villus in the ileum of PCO and BS groups, respectively.

ANEXOS

ANEXO	Página
TABELA 1A	Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 3 primeiras semanas pós-desmame.....84
TABELA 2A	Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de ração médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 3 primeiras semanas pós-desmame.....84
TABELA 3A	Análise de variância e coeficiente de variação para conversão alimentar de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 3 primeiras semanas pós-desmame.....84
TABELA 4A	Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 5 semanas pós-desmame.....85
TABELA 5A	Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de ração médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 5 semanas pós-desmame.....85
TABELA 6A	Análise de variância e coeficiente de variação para conversão alimentar de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 5 semanas pós-desmame.....85
TABELA 7A	Análise de variância e coeficiente de variação para comprimento de intestino delgado de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....86

TABELA 8A	Análise de variância e coeficiente de variação para peso relativo de intestino delgado de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	86
TABELA 9A	Análise de variância e coeficiente de variação para altura de vilosidades do duodeno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	86
TABELA 10A	Análise de variância e coeficiente de variação para relação vilo:cripta no duodeno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	87
TABELA 11A	Análise de variância e coeficiente de variação para profundidade de cripta no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	87
TABELA 12A	Análise de variância e coeficiente de variação para altura de vilosidades no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	87
TABELA 13A	Análise de variância e coeficiente de variação para largura de vilosidades no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	88
TABELA 14A	Análise de variância e coeficiente de variação para relação vilo:cripta no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	88
TABELA 15A	Análise de variância e coeficiente de variação para profundidade de cripta no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....	88

- TABELA 16A Análise de variância e coeficiente de variação para altura de vilosidades no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....89
- TABELA 17A Análise de variância e coeficiente de variação para largura de vilosidades no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....89
- TABELA 18A Análise de variância e coeficiente de variação para relação vilo:cripta no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....89
- TABELA 19A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido láctico no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....90
- TABELA 20A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido láctico no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....90
- TABELA 21A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido acético no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....90
- TABELA 22A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido acético no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....91

- TABELA 23A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido propiônico no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....91
- TABELA 24A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido propiônico no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....91
- TABELA 25A Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido butírico no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.....92
- TABELA 26A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido butírico no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....92
- TABELA 27A: Análise de variância e coeficiente de variação para pH do conteúdo intestinal do ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....92
- TABELA 28A: Análise de variância e coeficiente de variação para pH do conteúdo intestinal do cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....93
- TABELA 29A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de IgA muco-ileal de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....93

TABELA 30A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de IgG sérico de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....93

TABELA 31A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de IgM sérico de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.....94

TABELA 1A Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 3 primeiras semanas pós-desmame

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	7146,960000	1786,740000	0,389	0,8134
Tratamento	4	13248,560000	3312,140000	0,721	0,5900
Erro	16	73487,040000	4592,940000		
CV(%)	16,50				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 2A: Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de ração médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 3 primeiras semanas pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	19061,200000	4765,300000	1,396	0,2798
Tratamento	4	18367,600000	4591,900000	1,346	0,2962
Erro	16	54603,200000	3412,700000		
CV(%)	8,39				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 3A: Análise de variância e coeficiente de variação para conversão alimentar de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 3 primeiras semanas pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,044856	0,011214	0,309	0,8677
Tratamento	4	0,115576	0,028894	0,796	0,5449
Erro	16	0,580624	0,036289		
CV(%)	11,09				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 4A: Análise de variância e coeficiente de variação para ganho de peso médio diário de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 5 semanas pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	7813,040000	1953,260000	0,670	0,6221
Tratamento	4	2819,840000	704,960000	0,242	0,9104
Erro	16	46636,160000	2914,760000		
CV(%)	10,32				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 5A: Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de ração médio diário de leitões suplementados promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 5 semanas pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	18541,840000	4635,460000	1,156	0,3667
Tratamento	4	1876,640000	469,160000	0,117	0,9746
Erro	16	64174,560000	4010,910000		
CV(%)	11,09				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 6A: Análise de variância e coeficiente de variação para conversão alimentar de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, durante as 5 semanas pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,027856	0,006964	0,975	0,4482
Tratamento	4	0,019416	0,004854	0,680	0,6159
Erro	16	0,114224	0,007139		
CV(%)	4,86				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 7A: Análise de variância e coeficiente de variação para comprimento de intestino delgado de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	4,383264	1,095816	2,555	0,0792
Tratamento	4	26,847784	6,711946	15,649	0,0000
Erro	16	6,862696	0,428919		
CV(%)	7,04				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 8A: Análise de variância e coeficiente de variação para peso relativo de intestino delgado de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,770905	0,192726	0,571	0,6875
Tratamento	4	4,352135	1,088034	3,223	0,0404
Erro	16	5,400710	0,337544		
CV(%)	15,08				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 9A: Análise de variância e coeficiente de variação para altura de vilosidades do duodeno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	4,031226	1,007807	0,549	0,7027
Tratamento	4	17,239382	4,309846	2,346	0,0986
Erro	16	29,392114	1,837007		
CV(%)	7,15				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

TABELA 10A: Análise de variância e coeficiente de variação para relação vilo: cripta no duodeno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	8,142628	2,035657	0,183	0,9437
Tratamento	4	120,454495	30,113624	2,711	0,0674
Erro	16	177,747336	11,109209		
CV(%)	9,99				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 11A: Análise de variância e coeficiente de variação para profundidade de cripta no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	4,313952	1,078488	0,457	0,7662
Tratamento	4	18,703556	4,675889	1,981	0,1461
Erro	16	37,772709	2,360794		
CV(%)	9,53				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 12A: Análise de variância e coeficiente de variação para altura de vilosidades no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	7,380051	1,845013	1,709	0,1971
Tratamento	4	10,986848	2,746712	2,545	0,0800
Erro	16	17,268560	1,079285		
CV(%)	5,93				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

TABELA 13A: Análise de variância e coeficiente de variação para largura de vilosidades no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	42,377251	10,594313	1,004	0,4343
Tratamento	4	39,712127	9,928032	0,941	0,4657
Erro	16	168,855727	10,553483		
CV(%)	20,42				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 14A: Análise de variância e coeficiente de variação para relação vilosidade no jejuno de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	64,289858	16,072465	0,958	0,4568
Tratamento	4	51,024859	12,756215	0,761	0,5660
Erro	16	268,35433	16,772146		
CV(%)	11,82				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 15A: Análise de variância e coeficiente de variação para profundidade de cripta no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	8,097481	2,024370	0,832	0,5243
Tratamento	4	27,245577	6,811394	2,800	0,0616
Erro	16	38,927944	2,432997		
CV(%)	10,39				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 16A: Análise de variância e coeficiente de variação para altura de vilosidades no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	10,109058	2,527264	2,706	0,0677
Tratamento	4	48,822985	12,205746	13,069	0,0001
Erro	16	14,942883	0,933930		
CV(%)	5,77				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 17A: Análise de variância e coeficiente de variação para largura de vilosidades no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	5,506487	1,376622	0,380	0,8196
Tratamento	4	39,058448	9,764612	2,696	0,0685
Erro	16	57,951858	3,621991		
CV(%)	12,87				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 18A: Análise de variância e coeficiente de variação para relação vilosidade:cripta no íleo de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	49,071161	12,267790	1,397	0,2795
Tratamento	4	205,009189	51,252297	5,837	0,0043
Erro	16	140,483531	8,780221		
CV(%)	8,34				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 19A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido láctico no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,401817	0,100454	2,484	0,0853
Tratamento	4	0,104433	0,026108	0,646	0,6379
Erro	16	0,647007	0,040438		
CV(%)	8,55				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 20A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido láctico no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,320525	0,080131	1,172	0,3599
Tratamento	4	0,523825	0,130956	1,916	0,1568
Erro	16	1,093565	0,068348		
CV(%)	11,16				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 21A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido acético no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	9,914032	2,478508	1,567	0,2311
Tratamento	4	3,954019	0,988505	0,625	0,6516
Erro	16	25,313478	1,582092		
CV(%)	13,88				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 22A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido acético no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	2,047545	0,511886	0,461	0,7633
Tratamento	4	3,276505	0,819126	0,738	0,5798
Erro	16	17,766767	1,110423		
CV(%)	11,22				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 23A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido propiônico no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	1,709787	0,427447	0,818	0,5321
Tratamento	4	8,056169	2,014042	3,856	0,0223
Erro	16	8,357295	0,522331		
CV(%)	14,46				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 24A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido propiônico no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	1,111129	0,277782	0,821	0,5308
Tratamento	4	1,113806	0,278451	0,823	0,5296
Erro	16	5,415983	0,338499		
CV(%)	11,30				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 25A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido butírico no ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	8,651621	2,162905	1,992	0,1443
Tratamento	4	4,573767	1,143442	1,992	0,4112
Erro	16	17,372181	1,085761		
CV(%)	19,34				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 26A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de ácido butírico no cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	9,134203	2,283551	1,443	0,2655
Tratamento	4	11,042753	2,760688	1,745	0,1895
Erro	16	25,320004	1,582500		
CV(%)	20,12				

¹Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

TABELA 27A: Análise de variância e coeficiente de variação para pH do conteúdo intestinal do ceco de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,590456	0,147614	2,120	0,1256
Tratamento	4	0,183496	0,045874	0,659	0,6294
Erro	16	1,114224	0,069639		
CV(%)	4,25				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 28A: Análise de variância e coeficiente de variação para pH do conteúdo intestinal do cólon de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	0,135224	0,033806	0,358	0,8348
Tratamento	4	0,240344	0,060086	0,636	0,6440
Erro	16	1,510936	0,094434		
CV(%)	4,99				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 29A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de IgA muco-ileal de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	2091,727136	522,931784	0,062	0,9921
Tratamento	4	36460,167376	9115,041844	1,086	0,3964
Erro	16	134278,321224	8392,395077		
CV(%)	13,22				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 30A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de IgG sérico de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	10234,196816	2558,549204	1,226	0,3389
Tratamento	4	16741,854976	4185,463744	2,006	0,1422
Erro	16	33390,200264	2086,887516		
CV(%)	20,47				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).

TABELA 31A: Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de IgM sérico de leitões suplementados com promotor de crescimento, prebiótico e/ou probiótico, abatidos na 3ª semana pós-desmame¹.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	4	87478,681456	21869,670364	1,348	0,2954
Tratamento	4	80077,694816	20019,423704	1,234	0,3358
Erro	16	259565,539224	16222,846201		
CV(%)	24,59				

¹Opção de transformação: Variável sem transformação (Y).