

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Bruno Pinheiro Milnitsky

**ANÁLISE DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL POR
TRATAMENTO “IN VITRO” DE FEZES DE LEITÕES COM PREBIÓTICOS**

Porto Alegre
2024

Bruno Pinheiro Milnitsky

**ANÁLISE DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL POR
TRATAMENTO “IN VITRO” DE FEZES DE LEITÕES COM PREBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Gertrudes Corção

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Milnitsky, Bruno Pinheiro
ANÁLISE DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL
POR TRATAMENTO "IN VITRO" DE FEZES DE LEITÕES COM
PREBIÓTICOS / Bruno Pinheiro Milnitsky. -- 2024.
62 f.
Orientador: Gertrudes Corção.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Microbiologia. 2. Agropecuária. 3. Prebióticos.
4. Modelos in-vitro. I. Corção, Gertrudes, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Toda doença começa no intestino.”

Hipócrates

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof.^a Dr.^a Gertrudes, pela orientação prestada.

Aos membros do instituto de ciências básicas da saúde da UFRGS, que auxiliaram na realização deste estudo.

À minha família, pelo apoio e afeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

ANÁLISE DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL POR TRATAMENTO *IN VITRO* DE FEZES DE LEITÕES COM PREBIÓTICOS¹

Autor: Bruno Pinheiro Milnitsky

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Gertrudes Corção

RESUMO

Este estudo teve como objetivo utilizar um modelo *in vitro* para análise da microbiota gastrointestinal, simulada a partir de fezes provenientes de leitões desmamados, após tratamentos com prebióticos. O modelo utilizado foi separado em diferentes grupos conforme duas regiões do trato gastrointestinal, íleo e cólon proximal, e dois prebióticos foram utilizados, mananoligossacarídeos (MOS) e butirato de sódio. Metagenômica e culturômica foram utilizados em conjunto para avaliar os efeitos dos prebióticos sobre a composição da microbiota simulada, e testes de suscetibilidade a antimicrobianos e de concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizados para avaliar os efeitos dos prebióticos sobre os perfis de suscetibilidade das bactérias ali presentes. *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroida* e *Actinobacteria* foram os principais filos encontrados. A culturômica identificou 8 famílias e diversas espécies que não foram detectadas através da metagenômica. Os grupos que receberam MOS apresentaram um aumento na abundância de espécies e uma redução de bactérias portadoras de fímbrias do tipo I no cólon proximal, enquanto que os grupos que receberam butirato de sódio apresentaram um aumento de bactérias benéficas para o hospedeiro e uma redução de bactérias patogênicas. Quanto ao perfil de suscetibilidade, os tratamentos não foram capazes de exercer uma influência estatisticamente significativa sobre a suscetibilidade bacteriana a antibióticos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Janeiro, 2024.

ANALYSIS OF GASTROINTESTINAL MICROBIOTA MODULATION BY *IN VITRO* TREATMENT OF PIGLET FECES WITH PREBIOTICS ¹

Author: Bruno Pinheiro Milnitsky
Advisor: Prof. Dr. Gertrudes Corção

ABSTRACT

This study aimed to use an *in vitro* model to analyze the gastrointestinal microbiota, simulated from feces from weaned piglets, after receiving treatments with prebiotics. The model used was separated into different groups representing two regions of the gastrointestinal tract, ileum and proximal colon, and two prebiotics were used, mannanoligosaccharides (MOS) and sodium butyrate. Metagenomics and culturomics were used together to evaluate the effects of prebiotics on the composition of the simulated microbiota, as well as susceptibility and minimum inhibitory concentration (MIC) tests were used to evaluate the effects of prebiotics on the susceptibility profiles of the bacteria present there. *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroida* and *Actinobacteria* were the main phyla found. Culturomics identified 8 families and several species that were not detected through metagenomics. The groups that received MOS showed an increase in the abundance of species and a reduction of bacteria carrying type I fimbriae in the proximal colon, while the groups that received sodium butyrate showed an increase in bacteria beneficial to the host and a reduction of pathogenic bacteria. As for the susceptibility test, the treatments were not able to exert a statistically significant influence on bacterial susceptibility to antibiotics.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. January, 2024.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Microbiota trato gastrointestinal de leitões.....	4
3.2	Uso de prebióticos como substitutos de antibióticos	6
3.2.1	MOS	8
3.2.2	Butirato de sódio.....	9
3.3	Uso de omics para análise da diversidade microbiana.....	11
3.3.1	Uso da culturômica e metagenômica para análise da diversidade microbiana 11	
3.4	Aplicação de modelos <i>in vitro</i> para análise da microbiota gastrointestinal de leitões.....	13
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Modelo de estudo <i>in vitro</i> para a microbiota	16
4.2	Análise da diversidade bacteriana por culturômica	19
4.3	Análise da resistência a antibióticos	21
4.4	Análise estatística.....	23
4.4.1	Análise da diversidade bacteriana por sequenciamento de alto rendimento... 23	
4.4	Análise estatística.....	23
5.	RESULTADOS	224
5.1	Análise culturômica.....	25
5.2	Resultados da resistência a antibióticos.....	28
5.2.1	Análise de suscetibilidade à antibióticos na população bacteriana ...	28
5.2.2	Resultados da determinação da CIM dos isolados.....	31
5.3	Resultados das análises do sequenciamento de alto rendimento	34
6.	DISCUSSÃO	39
7.	CONCLUSÃO	46
8.	REFERÊNCIAS	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Resultados das análises de culturômica.....	29
Tabela 2 - Índices de diversidade de Simpson e Shannon da culturômica	30
..	
Tabela 3 - Resultados dos testes de suscetibilidade.....	30
Tabela 4 - Intervalo dos valores de concentração inibitória mínima.....	31
Tabela 5 - Comparação entre os valores de MIC ₅₀	32
Tabela 6 - Percentual em nível de gênero da abundância no grupo íleo.....	39
Tabela 7 - Percentual em nível de gênero da abundância no grupo cólon proximal.....	39
.	

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema detalhando o sistema <i>PolyFermS</i>	14
Figura 2 - Modelo baby-SPIME	15
Figura 3 - Esquema demonstrando o modelo de estudo <i>in vitro</i>	18
Figura 4 – Esquema da microplaca para teste de suscetibilidade.....	22
Figura 5 – Gráfico dos filos encontrados pela culturômica.....	25
Figura 6 - Gráfico das famílias encontrados pela culturômica	26
Figura 7 - Gráficos de alfa-diversidade dos grupos íleo.....	35
Figura 8 - Gráficos de alfa-diversidade dos grupos cólon proximal.....	36
Figura 9 – Gráficos dos filos e famílias encontradas pela metagenômica.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTM	Meio de Cultura dos Actinomicetos
ANOVA	Análise de variância
BHI	Infusão cérebro-coração
CIM	Concentração inibitória mínima
CLED	Cistina lactose deficiente de eletrólitos
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight</i>
MAO	Meio antioxidante
MCC	McConkey
MIC ₅₀	Concentração inibitória mínima 50
MOS	Mananoligossacarídeos
MRS	Man Rogosa e Sharpe
OTU	Unidade taxonômica operacional
PPGMAA	Programa de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativo
SAA	Sérum amilóide
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SHIME	<i>Simulator of human intestinal microbial ecosystem</i>
SPIME	<i>Simulator of pig intestinal microbial ecosystem</i>
TTC	Cloreto de tetrazólio

1. INTRODUÇÃO

O estudo da microbiota e sua influência sobre os organismos que habitam demonstraram, de maneira geral, diversos resultados promissores. A microbiota intestinal humana demonstrou a habilidade de modular o funcionamento do sistema imune e garantir seu funcionamento, e a variação na sua composição taxonômica pode estar associada ao desenvolvimento de doenças como Parkinson, diabetes, depressão, doenças cardiovasculares, obesidade entre outras. Coincidentemente, a microbiota também exerce semelhante influência sobre outros animais, modulando sua saúde e o funcionamento. Logo após o nascimento, a mucosa do trato gastrointestinal dos animais é colonizada por microrganismos benéficos e nocivos à saúde. A microbiota benéfica leva ao bem-estar do animal, e a nociva pode refletir de maneira negativa na saúde e desempenho do animal.

No setor da agropecuária, a carne suína é a mais consumida no mundo, sendo 36% do consumo de carne mundial, e apresenta um crescimento de 13,8% no consumo de 1990 a 2012. Por muito tempo, foram utilizados antibióticos para prevenir o desenvolvimento de doenças infecciosas em animais neste setor, mas estudos recentes demonstraram que o uso desta classe de medicamentos causa o aparecimento e disseminação de espécies bacterianas resistentes à antibióticos, o que apresenta um grande risco à saúde humana. Assim, o uso de probióticos e prebióticos poderiam ser uma possível alternativa para o uso de antibióticos na prevenção de doenças em suínos na área agropecuária.

Dentre os prebióticos, destacam-se os mananoligossacarídeos e o ácido butírico. Os mananoligossacarídeos podem ser utilizados como aditivos de ração animal por apresentar efeitos benéficos à saúde de animais através do estímulo do crescimento das bactérias benéficas e a redução de espécies nocivas, principalmente através da inibição da invasão de patógenos pelo epitélio intestinal ao bloquear a adesão pelas fímbrias do tipo I bacterianas. O ácido butírico, apesar de ser naturalmente presente no trato gastrointestinal, sendo produzido por certas enterobactérias ali presentes, também faz parte da escolha de aditivos alimentares para animais de produção. Sua presença no trato gastrintestinal é essencial para a saúde do hospedeiro, mantendo a homeostase e permeabilidade normal do intestino e reduzindo as populações de bactérias nocivas através da redução do pH intestinal.

Atualmente, há também interesse na construção de modelos experimentais *in*

in vitro que não utilizem animais e que permitam a observação das alterações da microbiota por diferentes tratamentos. O desenvolvimento destes modelos facilita o conhecimento da microbiota do trato gastrointestinal de animais e a compreensão de como o uso de moléculas prebióticas, de probióticos e de antibióticos, podem afetar o desenvolvimento das bactérias benéficas e nocivas à saúde do animal, causando uma modulação da microbiota gastrointestinal. Tais modelos permitiriam a realização de experimentos com menor custo e menores restrições éticas.

Outra metodologia de interesse para este tipo de estudo é a culturômica, uma técnica de alto rendimento que consiste na utilização de diversas culturas celulares para a identificação compreensiva das espécies presentes na amostra de interesse. Este método foi desenvolvido em resposta às limitações que a metagenômica (que envolve a análise de material genético proveniente de amostras coletadas do ambiente) apresenta, principalmente devido ao fato que a metagenômica detecta principalmente bactérias que não podem ser cultivadas em meios de cultura. A análise de microbiota através da culturômica, em certos casos, apresenta mais resultados em comparação com os métodos de metagenômica, o que sugere que a culturômica seja uma ferramenta mais adequada para a identificação das espécies presentes em um microbioma.

Os efeitos de prebióticos sobre a microbiota intestinal suína, no entanto, ainda não são bem estudados. Primeiramente, os métodos atuais que permitem a identificação das espécies bacterianas presentes na microbiota, como a metagenômica, possuem certas limitações; análises feitas com tais métodos detectam principalmente espécies que não são cultiváveis. O número de artigos que especificamente detalham a modulação de microbiota pela utilização de prebióticos ou da culturômica em suínos são poucos.

Portanto, este estudo tem como proposta desenvolver uma metodologia que envolva análise da modulação da microbiota de leitões através de um modelo *in vitro*, que simule tratamento com os prebióticos mananoligossacarídeos e ácido butírico em condições gastrointestinais e uso de culturômica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral do estudo

Averiguar os efeitos de prebióticos sobre a modulação da microbiota intestinal de leitões utilizando um modelo de estudo *in vitro*, desenvolvido *in house* que fornece uma simulação do trato gastrointestinal de leitões e a microbiota ali presente.

2.2.1 Objetivo específico 1

Analisar o crescimento de bactérias provenientes de amostras de fezes de leitões utilizando um modelo *in vitro*, na presença e ausência de prebióticos utilizados na produção de suínos para verificar se tais moléculas atuam na modulação da população bacteriana.

2.2.2 Objetivo específico 2

Utilizar culturomica e metagenomica para montar um perfil detalhado da microbiota intestinal de leitões, a partir do cultivo de amostras de fezes no modelo *in vitro*.

2.2.3 Objetivo específico 3

Realizar análise fenotípica da suscetibilidade à antibióticos das cepas bacterianas isoladas por culturomica para verificar se existe alteração no perfil de suscetibilidade das populações microbianas com o uso dos prebióticos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microbiota trato gastrointestinal de leitões

Estima-se que o número de bactérias presentes no cólon suíno seja cerca de 10^{10} e 10^{11} células por grama de fezes (Gaskins *et al*; 2002), uma densidade semelhante à dos seres humanos (10^{11} células por grama de fezes) (Hartl, Dykhuizen; 1984). De maneira semelhante aos seres humanos, leitões recebem uma colonização bacteriana ao nascerem, tais colonizadores são provenientes do leite materno (Liu *et al*; 2019), do ambiente e da alimentação (Bian *et al*; 2016). A microbiota intestinal de leitões é constituída principalmente pelas famílias *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* e *Clostridiaceae* e pelos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Clostridium* (íleo), *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Lactobacillus* (cólon), populações que se mantêm relativamente estáveis durante a fase de amamentação (Frese *et al*; 2015). Modificações na composição da microbiota suína somente começam a partir da introdução da dieta sólida, resultando no aumento das populações de *Prevotella* e *Ruminococcus*, bactérias associadas à digestão de nutrientes (Qi *et al*; 2021).

No entanto, é importante ressaltar que os resultados de tais análises populacionais variam conforme a metodologia utilizada: métodos independentes de cultura descrevem a microbiota intestinal de leitões dominada pelos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, cujas populações aumentam ao longo do crescimento do animal, e do gênero *Prevotella*, predominante durante os primeiros períodos da vida dos leitões, diminui nos outros estágios. Por outro lado, análises com métodos dependentes de cultura, relatam que a microbiota suína consiste principalmente dos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria* (cujas populações aumentam e diminuem ao longo da vida do animal, respectivamente) e pelos gêneros *Escherichia* (amplamente presente durante a infância dos leitões, sofrendo uma redução ao longo do crescimento), *Lactobacillus* e *Streptococcus* (cujas populações se mantêm relativamente constantes durante o desenvolvimento do animal) (Wang *et al*; 2021).

Mun *et al.* (2021) utilizaram métodos dependentes e independentes de cultivo para analisar a microbiota intestinal de leitões pós-desmame e de porcas adultas identificando e caracterizando as bactérias ali presentes através de sequenciamento do gene 16S rRNA e análise metagenômica. Os métodos de

culturômica revelaram que a microbiota dos leitões era predominantemente composta, em ordem decrescente, pelos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, e pelos principais gêneros *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Olsenella*. As porcas adultas, por outro lado, apresentaram a microbiota composta pelos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, e *Bacteroidetes*, e pelos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Bacteroides* e *Bacillus*. Gêneros isolados de ambos os grupos incluem *Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia* e *Lactobacillus*, este último sendo o mais comumente isolado em ambas as amostras. Os métodos de metagenômica, por outro lado, obtiveram resultados diferentes: na microbiota das porcas adultas, os filos dominantes, novamente em ordem decrescente, foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, e *Fibrobacteres*, e os gêneros dominantes foram *Treponema*, *Prevotella*, *Christensenella*, *Muribaculum*, e *Turicibacter*, enquanto que na microbiota dos leitões, os filos dominantes foram *Spirochaetes*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fibrobacteres*, *Candidatus*, *Melainabacteria*, e *Chlamydiae*, e os gêneros dominantes foram *Treponema*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, e *Barnesiella*.

Ke *et al.* (2019) realizaram uma análise da microbiota de leitões em 4 diferentes idades (25, 80, 120 e 240 dias) a partir de amostras de fezes. De maneira geral, o filo *Firmicutes* foi o mais abundante nos quatro estágios da vida, apesar de sua menor abundância em leitões com a idade de 25 dias. O filo *Bacteroidetes* aumentou no período entre 25 e 80 dias, mas sofreu uma diminuição nas etapas seguintes. Quanto aos gêneros, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, e *Prevotella* foram os mais abundantes no primeiro estágio, enquanto *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Treponema* foram os principais constituintes da microbiota suína a partir do dia 80.

Adicionalmente, existe outro fator externo que influencia a composição e o desenvolvimento da microbiota suína: no setor de agropecuária, animais jovens passam por um processo denominado “desmame”, onde o animal é separado da mãe e ocorre a troca da dieta líquida (leite materno) por uma dieta sólida. Apesar de ser um processo necessário, estudos demonstram que o desmame pode ter efeitos nocivos sobre os leitões, como o aumento de estresse, alteração da permeabilidade da barreira intestinal, diminuição do crescimento, alterações na microbiota intestinal,

enfraquecimento do sistema imune e aumento do risco de doenças (van der Meulen *et al*; 2010).

O processo de desmame causa modificações fisiológicas no intestino suíno, principalmente através da disfunção das proteínas de junção e danos na camada da mucosa (Pluske; 2013). Esta alteração funcional do intestino prejudica a absorção de nutrientes, agravando as complicações decorrentes do processo de desmame e desencadeia a desenvoltura da diarreia pós-desmame, uma das principais causas do enfraquecimento e morte dos suínos no setor de agropecuária (Kongsted *et al*; 2014). Para avaliar a composição da microbiota em porcos com diarreia, Dou *et al* (2017) realizou uma comparação entre leitões saudáveis e acometidos por diarreia, observando que os porcos saudáveis apresentaram populações maiores das famílias bacterianas *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococaceae* e *Lactobacillaceae*, sugerindo que modificações na microbiota possam tornar os animais mais suscetíveis a desenvolver a diarreia pós-desmame.

Tais estudos demonstram que é possível obter uma visão geral da população bacteriana presente no intestino suíno, mas a identificação precisa das espécies ali presentes se demonstra difícil devido à discrepância entre os resultados de diferentes estudos. É possível que os métodos convencionais utilizados para a análise da microbiota não sejam capazes de detectar corretamente todas as espécies presentes na microbiota, e que métodos adicionais sejam necessários.

3.2 Uso de prebióticos como substitutos de antibióticos

Na indústria agropecuária, é de interesse manter os animais saudáveis, uma vez que doenças causam a perda de animais, redução do bem-estar animal e a diminuição da qualidade do produto, ou seja, perda econômica para o país produtor. Por muito tempo, antibióticos têm sido utilizados para prevenir o desenvolvimento de doenças infecciosas em animais neste setor, mas estudos recentes demonstraram que o uso indiscriminado desta classe de medicamentos causa o desenvolvimento de espécies resistentes à antibióticos (Tang, Karen *et al*; 2017), o que apresenta um grande risco à saúde humana. Por este motivo, diversas indústrias agropecuárias reduziram a utilização de antibióticos nos animais, e surgiu o interesse por alternativas que providenciem uma proteção contra doenças sem desenvolver espécies microbianas resistentes à antibióticos ou alterar minimamente a microbiota

do animal. Um possível candidato para substituir os antibióticos no setor de agropecuária são os prebióticos, substâncias que estimulam o crescimento e desenvolvimento de microrganismos que são considerados benéficos para a saúde do hospedeiro. Sendo fibras indigestíveis, os prebióticos tem menor sensibilidade do que probióticos, que são organismos vivos. Quando utilizados em conjunto, contudo, seus efeitos benéficos podem ser potencializados (Arena *et al*, 2014).

Barszczet *al* (2016) analisou este possível efeito em conjunto através do uso de inulina (polissacarídeo vegetal) prebiótica proveniente de raiz de chicória ou alcachofra-de-jerusalém seca em leitões e diversos probióticos (*Lactococcus lactis*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*). O grupo que recebeu a raiz de chicória apresentou uma diminuição do pH e da atividade da beta-glucosidase no ceco, e um aumento de ácidos graxos de cadeia curta como os ácidos valéricos e propiônico; a utilização da alcachofra-de-jerusalém seca também reduziu o pH e a atividade da beta-glucosidase, e também diminuiu a concentração de isoácidos e aumentou as populações do gênero *Bifidobacterium* no cólon proximal e distal; o tratamento com os probióticos aumentaram os níveis de ácidos graxos de cadeia curta e do ácido cecal e as populações do gênero *Clostridium* no cólon distal. De maneira geral, o tratamento com a alcachofra-de-jerusalém seca teve maior efeito no intestino dos leitões do que a raiz de chicória, e a junção dos prebióticos com os probióticos não potencializou seus efeitos.

O oposto foi observado em um modelo de simulação do cólon suíno, onde foi avaliado a utilização em conjunto de uma espécie bacteriana probiótica (*Bifidobacterium thermophilum* RBL67) e prebióticos (Fructo-, Galacto- e Mananoligossacarídeos) contra uma bactéria patógena, *Salmonella enterica*. No controle, a *Salmonella* colonizou e se desenvolveu no meio normalmente, mas seu crescimento foi reduzido nos grupos que receberam os tratamentos, juntamente com um aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta. A redução foi maior nos grupos que receberam ambos os tratamentos, sugerindo que a utilização de probióticos e prebióticos em conjunto potencializa seu poder benéfico (Tanner *et al*; 2014).

3.2.1 – MOS

MOS são fibras insolúveis provenientes da parede celular de leveduras. Como prebióticos, eles são capazes de modificar as populações bacterianas do microbioma intestinal (Gibson *et al*; 1995) e são um potencial substituto de antibióticos como promotor de crescimento em animais (Saeed *et al*; 2017). No entanto, a principal característica de interesse é sua capacidade de interferir no processo de colonização de bactérias que contenham fímbrias do tipo I. Tais bactérias utilizam suas fímbrias para se aderir às células epiteliais do intestino, o que permite a colonização deste ambiente (Althouse *et al*; 2003). Os MOS interferem neste processo ao se ligarem às fímbrias bacterianas, impedindo a sua adesão no epitélio (Spring *et al*; 2000).

A utilização de prebióticos como MOS de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) demonstraram efeitos benéficos sobre a saúde de bovinos, reduzindo a concentração de amônia e aumentando o pH no rúmen dos animais, assim como aumentando os níveis de ácidos graxos de cadeia curta, e uma menor presença de lipopolissacarídeos (LPS) e sêrum amiloide A (SAA) na corrente sanguínea, o que reduziu a ocorrência de reações inflamatórias nos animais (Garcia Diaz *et al*; 2018).

Tais efeitos pela utilização de MOS foram também observados por Gainza e Romero (2020), não em mamíferos, mas em crustáceos da espécie *Litopenaeus vannamei*, também conhecido como “camarão de pata branca”. De maneira semelhante à agropecuária, o setor de aquicultura sofre perdas econômicas devido a doenças que afetam o produto, e procura por alternativas para substituir a utilização de antibióticos. Neste caso, a criação do camarão de pata branca é prejudicada pela síndrome de necrose aguda hepatopancreática, uma doença causada pela bactéria *Vibrio parahaemolyticus* e seus metabólitos tóxicos (Tran *et al*; 2013). A utilização dos MOS como aditivos na alimentação dos camarões aumentou a biomassa colhida pelo aquicultivo, uma consequência da diminuição da perda de camarões durante o cultivo. O aumento da sobrevivência dos animais pode ser atribuído a modificações positivas na sua microbiota, marcadas pela multiplicação de bactérias do filo *Actinobacteria*, e uma redução do filo *Proteobacteria*, assim como um maior número de bactérias do gênero *Lactococcus* e do filo *Verrucomicrobiaceae*, e menores populações de gêneros contendo bactérias patogênicas oportunistas, como *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bergeyella* e *Shewanella*. É sugerido que este efeito conferido pelos MOS ocorre devido a seu potencial de interferir com o processo de adesão de

patógenos ao epitélio do organismo hospedeiro, dificultando a colonização do ambiente intestinal por estas bactérias nocivas.

Quando utilizados em suínos, os MOS apresentam resultados promissores. Os MOS são capazes de aumentar o desempenho de crescimento de leitões quando introduzidos no momento do desmame (Miguel *et al*; 2004) e de fortalecer o epitélio intestinal, estimulando o crescimento das vilosidades e aumentando a absorção de nutrientes (Poeikhampha *et al*; 2011). Xudong *et al* (2019) adicionaram o prebiótico na ração de porcas e leitões, resultando em um aumento de *Lactobacillus* e uma diminuição de *Escherichia coli* na região do jejuno, assim como a diminuição dos níveis de fatores inflamatórios na região intestinal.

3.2.2 – Butirato de sódio

Ácido butírico é um ácido carboxílico geralmente encontrado no sistema digestivo de mamíferos, produzido por bactérias ali presentes. Tal ácido é indispensável para o funcionamento do organismo hospedeiro, regulando o equilíbrio metabólico e o funcionamento do sistema imune (Kasubuchi *et al*; 2015), e influenciando a diferenciação de linfócitos T reguladores (Furusawa *et al*; 2014).

Qi *et al* (2021), além de avaliar a composição da microbiota de leitões durante seu crescimento, também realizou uma análise bioquímica de metabolitos produzidos pelas bactérias, principalmente os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) e bioaminas. Estes ácidos graxos, principalmente o butirato, são responsáveis pela manutenção da barreira epitelial do intestino (Burger-van Paassen *et al*; 2009), enquanto as bioaminas são substâncias orgânicas ativas com nitrogênio que exercem a função de neuromodulação em animais (Nobuyuki; 2019). Os níveis de SCFAs no intestino dos leitões aumentou drasticamente ao longo do seu crescimento, enquanto as bioaminas demonstraram um aumento mais sutil; histamina, em particular, apresentou o maior aumento, enquanto a putrescina diminuiu. Adicionalmente, Qi *et al* (2021) analisou o desenvolvimento do epitélio intestinal, observando um aumento da grossura do epitélio, a proliferação de ocludina (proteína de junção) e o aumento de células e fatores imunes. O artigo conclui que diversos fatores, sejam eles internos ou externos, influenciam o desenvolvimento da microbiota dos leitões, e por consequência, sua saúde e funcionamento metabólico.

O butirato pode ser utilizado como suplemento na forma de butirato de sódio (sal derivado do ácido butírico), como demonstrado por Sun *et al* (2020) em um estudo que avaliou os efeitos da utilização deste sal como um aditivo na alimentação de suínos. O experimento envolveu a utilização de suínos distribuídos em 3 grupos: controle negativo (dieta basal), controle positivo (dieta basal com bacitracina de zinco) e butirato de sódio (dieta basal com o prebiótico). Os grupos que receberam o aditivo e o controle positivo apresentaram um peso corporal e média de ganho de peso diário maior do que o grupo negativo, assim como um aumento da ingestão da ração, aumento do peso da carcaça, e a diminuição da taxa de conversão do alimento. De maneira geral, o butirato de sódio melhorou o desempenho dos suínos, possivelmente através da estimulação da pepsina e enzimas digestivas, que promovem o crescimento das vilosidades intestinais e o desenvolvimento da comunidade microbiana, aprimorando a absorção de nutrientes. O butirato de sódio é, adicionalmente, uma fonte de energia para as células epiteliais do intestino, reduzindo a sua utilização de aminoácidos e glicose, permitindo a sua utilização no crescimento do animal. De maneira complementar, o sal também reduz o pH, potencializando a digestão de nutrientes, e mantém a barreira epitelial do intestino, prevenindo o escape de metabólitos bacterianos potencialmente inflamatórios ou danosos (Sun *et al*; 2020).

Probióticos também apresentam um potencial para serem utilizados para a modulação da microbiota suína. A utilização da bactéria *Clostridium butyricum* como aditivo alimentar, por exemplo, causa modificações na população da microbiota e composição metabólica de leitões, levando à uma redução da ocorrência de diarreia, um aumento de espécies produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, como *Megasphaera*, *Ruminococcaceae*, e *Oscillospira*, e um aumento de metabólitos essenciais para a saúde do animal como Citrulina, Valina, Prolina, e ácidos dicarboxílicos de média e longa cadeia (Liang *et al*; 2021). Tais efeitos foram semelhantemente observados por Fu *et al* (2021), que analisaram a utilização de *Clostridium butyricum* ZJU-F1 em leitões que passaram por desmame, sozinho ou em conjunto com outro probiótico, *Bacillus licheniformis*. Os grupos que receberam os probióticos apresentaram melhor digestão intestinal de nutrientes, uma diminuição da permeabilidade intestinal, um aumento da expressão de proteínas de junção e mucina, aumento da expressão de peptídeos antimicrobianos no íleo, e um aumento de metabólitos como ácido butírico, ácido propanoico, e ácido acético. Apesar do fato

que a utilização de probióticos não seja o foco principal deste estudo, seu uso em conjunto com os prebióticos pode potencializar os efeitos benéficos que ambos oferecem, como observado por Tanner *et al* (2014).

3.3 - Uso de *omics* para análise da diversidade microbiana

Omic é um termo em inglês que se refere à um grupo de técnicas e ferramentas utilizadas para a identificação das características de seres vivos. Alguns exemplos destas ferramentas são: a metagenômica, que investiga material genético presente em um ambiente pelo sequenciamento do DNA; transcriptômica, que estuda todo o material originado da transcrição do RNA de um organismo pelo sequenciamento do RNA; e a proteômica, que analisa proteínas produzidas por um organismo pela espectrometria de massa. Existem diversas outras técnicas que fazem parte deste grupo, e todas compartilham o mesmo sufixo *-omics* (Dai *et al*; 2022).

3.3.1 Uso da culturômica e metagenômica para análise da diversidade microbiana

Técnicas de metagenômica surgiram como uma alternativa aos métodos tradicionais dependentes de cultura. A grande maioria dos microrganismos presentes no ambiente não são cultiváveis, severamente limitando a identificação de populações microbianas no ambiente através destes métodos. A metagenômica, utilizando métodos independente de cultura, permite a análise populacional mais precisa (Philip *et al*; 1996).

Apesar disto, a metagenômica possui certas limitações: tais métodos não levam em consideração a expressão dos genes de interesse, são complexos e custosos, suscetíveis à contaminantes e dependentes de comparações a bases de dados existentes e não são capazes de detectar espécies que sejam menos abundantes. Adicionalmente, os resultados a partir de curtos fragmentos de material genético podem não ser precisos (Wang *et al*; 2015).

A culturômica, um possível complemento às técnicas de metagenômica, é um método dependente de cultura com amplo espectro, que visa cultivar microrganismos previamente considerados “não cultiváveis” através da utilização de

meios de cultura mais específicos. Embora não seja precisa quando utilizada exclusivamente, os métodos de culturomica demonstram resultados promissores quando utilizados de maneira complementar à metagenômica (Lagier *et al*; 2015).

A culturomica é suplementada pelo método de identificação de espécies por espectrometria de massa *matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight* (MALDI-TOF), ao contrário da metagenômica que depende de sequenciamento *shot-gun* ou sequenciamento de alto rendimento do gene 16S RNA. Esta técnica permite a identificação de espécies bacterianas do ambiente, identificação de espécies resistentes à antibióticos, identificação de cepas e taxonomia, e possui diversas outras aplicações na virologia e micologia (Singhal *et al*; 2015).

Wang *et al* (2021) observou, através da utilização de 53 métodos de cultura e sequenciamento de amplicons gene 16S RNA, diferentes resultados ao analisar a microbiota suína, em diferentes estágios da vida do animal. Foram encontrados 378, 482, 565 e 555 sequências variantes de amplicons nas fases de fim da lactação, amamentação, crescimento e estágio final, respectivamente, através de métodos independentes de cultura, enquanto 415, 675, 808 e 823 sequências variantes de amplicons foram encontradas através de métodos dependentes de cultura. Somente 171, 264, 301 e 313 sequências foram encontradas por ambos os métodos, indicando que a culturomica identificou espécies não encontradas pelos métodos independentes de cultura. Os autores sugeriram que certas bactérias não são detectadas via métodos tradicionais por uma variedade de motivos, como número abaixo do limite de detecção do sequenciamento, lise incompleta da célula bacteriana durante a extração de DNA, ou amplificação incorreta durante o PCR.

Mun *et al* (2021) realizou uma comparação de métodos independentes e dependentes de cultura, através da utilização de sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA e metagenômica para identificar as espécies bacterianas presentes na microbiota de leitões e porcas adultas. No total, foram identificadas 206 espécies bacterianas e 2 espécies de *Archaea*; destes, 23 espécies foram detectadas por culturomica, e 193 (contando as 2 espécies de *Archaea*) espécies foram detectadas por metagenômica. Apesar do fato de que a metagenômica apresentou mais resultados, 15 das bactérias identificadas pela culturomica não foram detectadas pelos métodos independentes de cultura.

3.4. Aplicação de modelos *in vitro* para análise da microbiota

gastrointestinal de leitões

Existe o interesse na construção de modelos experimentais *in vitro* que não utilizem animais, modelos biorrelevantes que permitem a simulação de organismos vivos, sem pôr em risco o seu bem-estar. Adicionalmente, o trato gastrointestinal suíno demonstra potencial como modelos para estudos devido à sua semelhança ao trato gastrointestinal humano, principalmente quanto à estrutura do sistema neural, processo de formação do pellet fecal e razão entre o peso dos órgãos e da microbiota intestinal (Nakashimada *et al*; 2011). Estes modelos geralmente são projetados a partir da análise da composição bioquímica do organismo de interesse, como a análise dos fluídos gastrointestinais suínos por Henze *et al.* (2020) para a obtenção de um modelo para análises farmacocinéticas.

Apesar do número limitado de estudos que descrevam a elaboração e utilização de tais meios para a simulação de organismos suínos, os estudos já existentes demonstram seu potencial como meio experimental. Tanner *et al* (2014) realizou um experimento avaliando os efeitos de probióticos (*Bifidobacterium thermophilium* RBL67) e de prebióticos (Fructo-, Galacto- e Mananoligossacarídeos) sobre a bactéria patogênica *Salmonella enterica* em um modelo simulando o cólon proximal suíno, o *PolyFermS* (Figura 1). Nas primeiras etapas dos testes, tanto o probiótico quanto a bactéria patógena foram capazes de colonizar o modelo com facilidade, e suas populações se tornaram estáveis em cerca de 2 dias. No entanto, a *Salmonella* permaneceu no sistema depois de uma higienização com cloro após os testes, indicando uma provável formação de biofilme. Foi sugerido, portanto, que os reatores sejam substituídos por unidades esterilizadas após cada experimento.

Nakashimada *et al* (2011) realizou uma avaliação do efeito de parede celular de levedura de Brewer sobre a microbiota suína com um modelo simulando o intestino grosso do animal, montado a partir de 3 frascos contendo um meio de cultura bioquimicamente semelhante ao ambiente intestinal e amostras de fezes. Este meio permitiu a manutenção das populações bacterianas ali presentes por uma semana de maneira estável, permitindo a avaliação do prebiótico.

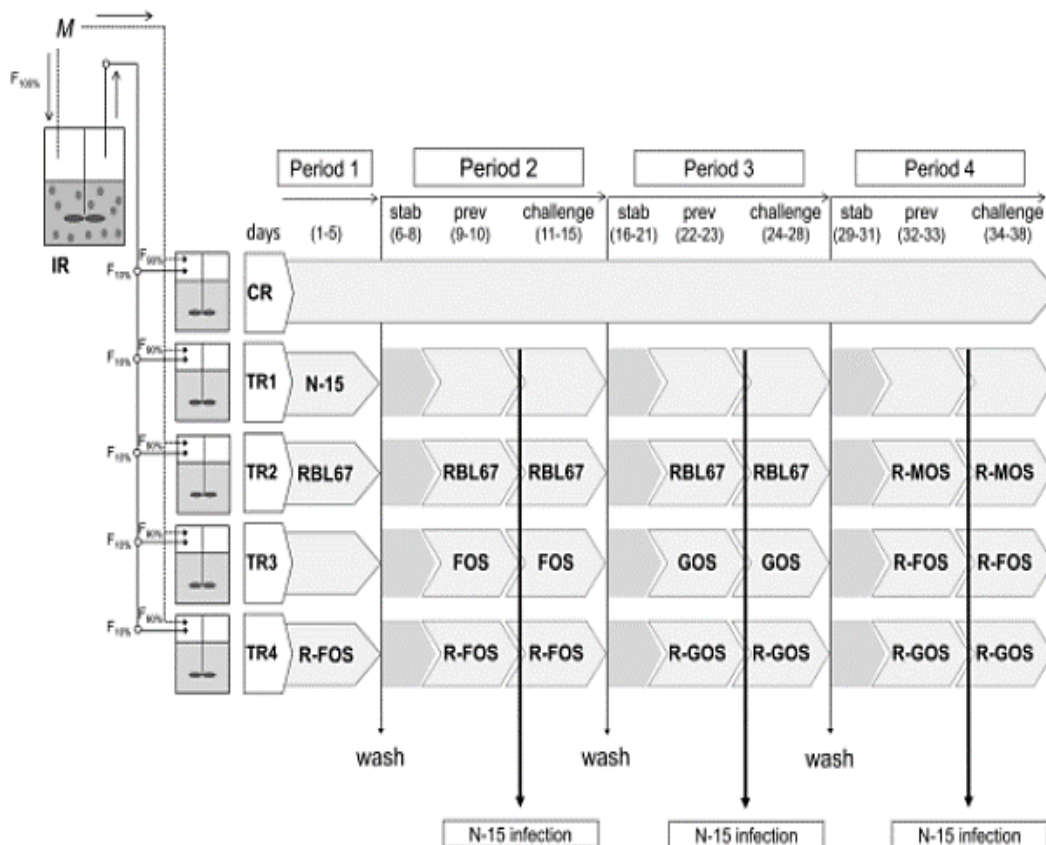


Figura 01 – Esquema detalhando o sistema *PolyFermS* utilizado por Tanner *et al* (2014) para a avaliação de probióticos e prebióticos. IR = reator de inoculo; CR = reator controle; TR = reatores teste 1-4; F = valor de fluxo; *stab* = estabilização; *prev* = prevenção; *challenge* = desafio com a *Salmonella* N-15; RBL67 = *Bifidobacterium thermophilum* RBL67; FOS = Fructoligossacarídeo; GOS = Galactoligossacarídeo; MOS = Mananoligossacarídeo.

Além do cultivo da microbiota gastrointestinal, os modelos também são capazes de simular alterações nas populações bacterianas. Dufourny *et al* (2019) construiu um modelo a partir de modificações ao modelo SHIME (*Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*), que é utilizado para a simulação da microbiota gastrointestinal humana (Van den Abbeele *et al*; 2010) com múltiplos compartimentos para a observação dos efeitos do desmame sobre a microbiota de leitões, denominado *baby-SPIME* (*Simulator of Pig Intestinal Microbial Ecosystem*) (Figura 2). Cada compartimento utilizado representava uma seção do trato gastrointestinal suíno, ligados por bombas peristálticas e organizados a fim de simular o fluxo de nutrientes através do sistema digestório. Este modelo apresentou populações bacterianas semelhantes à microbiota descrita em estudos *in vivo*, e reproduziu os efeitos da transição da dieta líquida para sólida sobre a microbiota com sucesso.

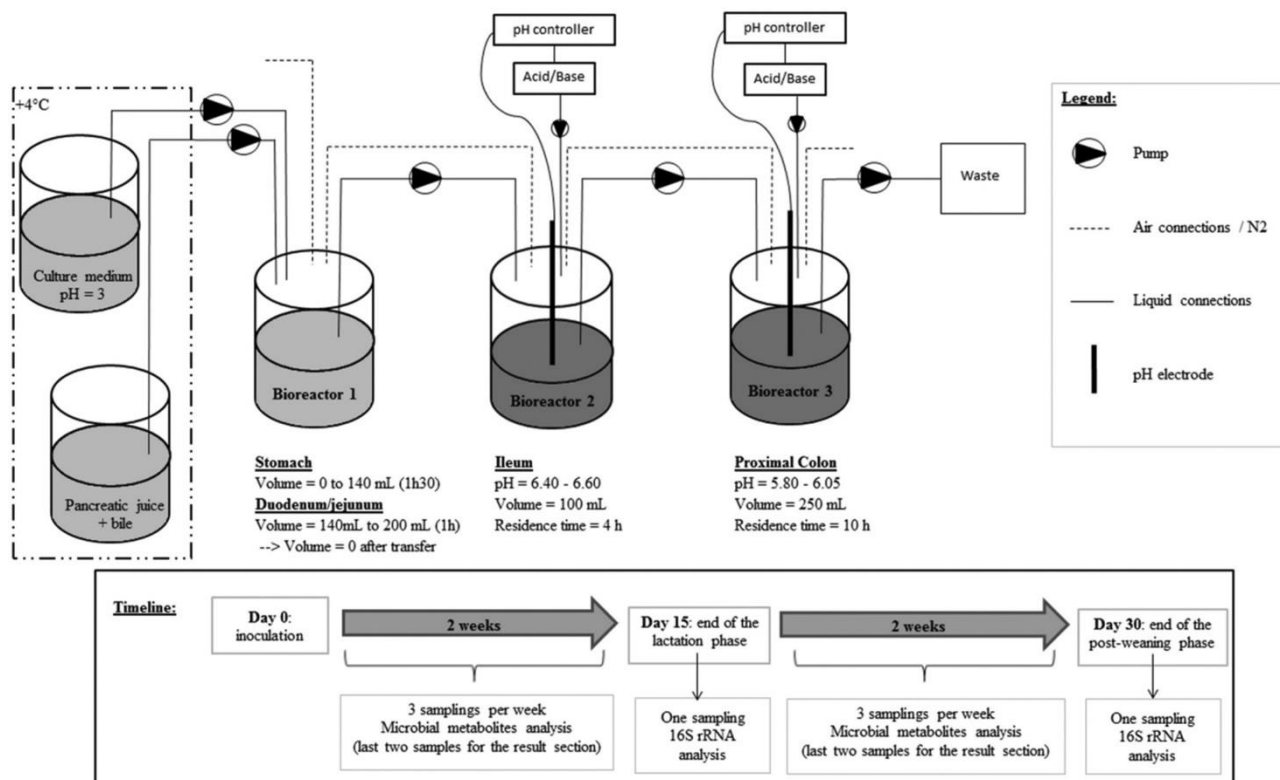


Figura 02 – Modelo *baby-SPIME* formulado por Dufourny *et al* (2019). O biorreator 1 representou o estômago, duodeno e jejuno; o biorreator 2 representou o íleo; e o biorreator 3 representou o cólon proximal. Os dois frascos à esquerda continham o meio de cultura e suco pancreático, que foram continuamente bombeados de um compartimento para o outro, até serem descartados. O ambiente anaeróbico foi mantido com a utilização de nitrogênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Modelo de estudo *in vitro* para a microbiota

As amostras fecais utilizadas para o experimento foram adquiridas de leitões desmamados alimentados com ração sem antibióticos, mantidos no departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia da UFRGS, disponibilizados pelo professor Alexandre Kessler. Neste departamento, haviam 25 gaiolas metabólicas, cada uma contendo um leitão. Fezes presentes em cada gaiola metabólica foram coletadas e reunidas em 8 potes de plástico. Os potes das amostras foram mantidos em uma caixa com gelo durante o transporte. 2g de cada um dos 8 potes foi utilizado para a confecção de 6 pools de fezes (cada um com 16g de fezes) para serem utilizados nos experimentos. As fezes foram homogeneizadas em água peptonada antes de serem inseridas no modelo a fim de facilitar a inoculação.

O meio utilizado para a cultura das amostras coletadas foi preparado a partir de modificações ao meio utilizado por Dufourny *et al* (2019). Este meio, denominado meio antioxidante (MAO), consiste na união de 3 soluções diferentes: solução 1 (TRIS 3 g/L, Dextrose 5 g/L), solução 2 (extrato de levedura 5 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L, triptona 5,67 g/L e caldo triptona de soja 5 g/L) e solução 3 (L-Cisteína 0,4 g/L, ácido ascórbico 1 g/L, ketoglutamina 0,2 g/L, fosfato de hidrogênio dipotássio 0,8 g/L, ácido úrico 0,4 g/L, glutathiona 0,1 g/L). Tais soluções foram preparadas e esterilizadas separadamente, conforme o protocolo original (Dione *et al.*, com modificações), com o objetivo de reduzir a possível emissão de radicais livres durante a preparação. As soluções 1 e 2 foram esterilizadas através da utilização de autoclave (121°C, 15 minutos, 1 atmosfera). Devido à presença de materiais termosensíveis, a solução 3 foi esterilizada por método de filtração em membrana de ésteres mistos (poro 0,22µm).

A montagem do modelo simulando o ambiente gastrointestinal suíno foi realizada segundo o biorreator baby-SPIME com modificações. Seis frascos (500mL) contendo 100ml de Solução Base? (Fosfato dihidrogênio de Sódio 0,67 g/L, hidróxido de sódio 0,54 g/L, cloreto de sódio 7,91 g/L, lecitina de soja 0,124g/L), foram divididas em dois grupos representando diferentes secções do trato gastrointestinal: três (A, B e C) para o íleo (pH 6,4) e três (A, B e C) para o cólon proximal (pH 5,8) (Figura 3). Os valores de pH de cada frasco foram ajustados conforme seu grupo. Os seis pools

de fezes foram primeiramente inoculados (na concentração 10%) nestes frascos e incubados em 39.5°C por 14 horas. Em seguida, 50mL do sobrenadante de cada garrafa foi retirado, e 50mL de uma mistura do meio antioxidante e suco pancreático (pancreatina 0,2%, bile bovina 7,68 g/L) foi adicionado. As garrafas foram novamente incubadas a 39.5°C durante 24 horas.

Após este período de incubação, os tratamentos prebióticos foram adicionadas aos frascos. Os frascos “A” não receberam nenhum tratamento, sendo o grupo controle; os frascos “B” receberam MOS 0,08% e as frascos “C” receberam Butirato de sódio na concentração de 5,5 g/L. Os seis frascos (ILA, ILB, ILC, CPA, CPB e CPC) foram incubados com os tratamentos em 39.5°C por 18 horas.

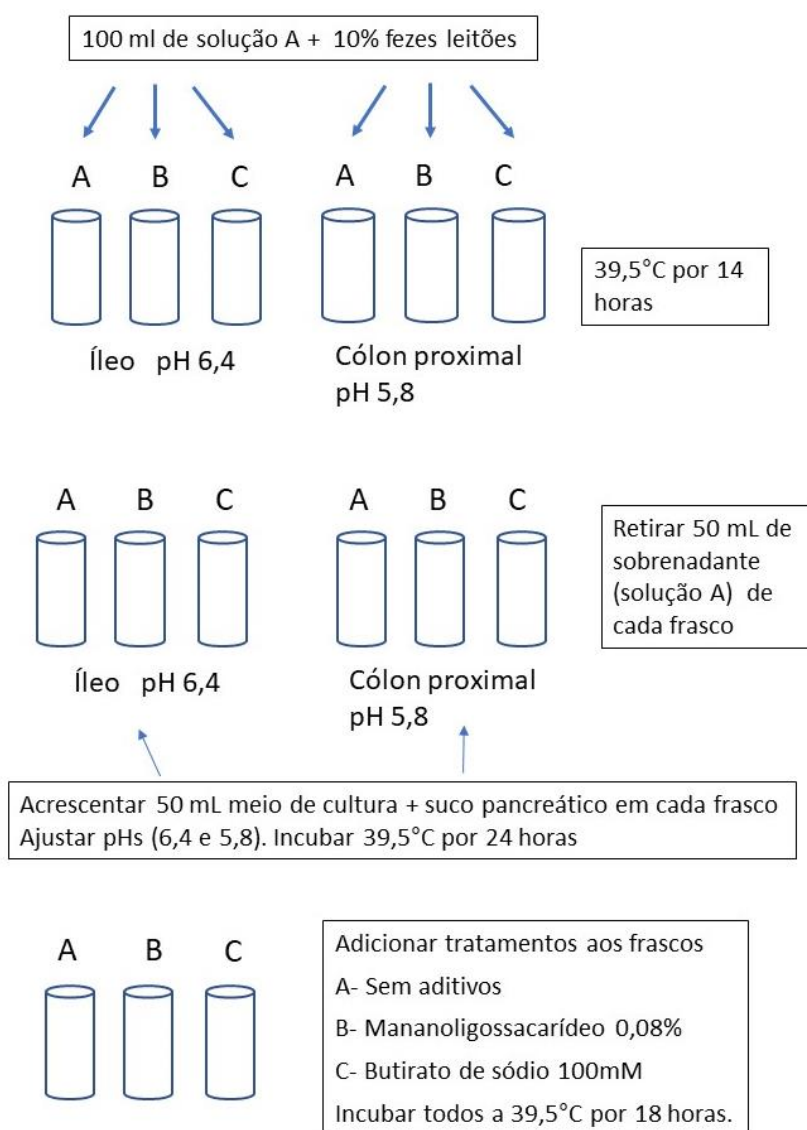


Figura 03 – Esquema demonstrando o processo de montagem do modelo de estudo *in vitro* segundo o biorreator *baby*-SPIME, Dufourny *et al* (2019), com modificações, desenvolvido *in house* para o cultivo da microbiota gastrointestinal de leitões.

Após a incubação, os frascos que receberam o tratamento por MOS passaram por um processo de filtração devido à sua capacidade de reter bactérias produtoras fímbrias tipo I. O conteúdo dos frascos ILB e CPB foram filtrados diversas vezes a fim de eliminar os grumos de fezes que interfeririam na filtragem posterior. Foram utilizados filtros convencionais (Whatmann 1, qualitativo) para a remoção de partículas maiores, e um microfiltro de ésteres mistos (poro 3µm) para a filtração final, com o objetivo de retenção das bactérias aderidas ao manano do meio de cultura (Posadas *et al.*, 2003).

4.2 - Análise da diversidade bacteriana por culturômica

20mL de cada frasco (ILA, ILC, CPA, CPC e filtrado dos frascos CPB e ILB) foram transferidos para novos frascos contendo 380mL do meio MAO. Após 24 horas de incubação a 39,5°C, alíquotas de 1mL foram retiradas semanalmente durante o período de um mês, resultando em 4 repetições. Cada alíquota foi diluída serialmente, até a diluição 1×10^{-4} , resultando em 5 concentrações diferentes (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Para a realização da culturômica, foram utilizadas placas (90x15 mm) de ágar contendo os meios MAO, Man Rogosa e Sharpe (MRS), e McConkey (MCC). 200µL de cada diluição foi semeada nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em 38°C por 20-24 horas, e após este período foram examinadas para verificar a presença de colônias visíveis. Colônias isoladas foram separadas para a futura identificação, colônias morfologicamente distintas foram re-isoladas por semeaduras em esgotamento adicionais até o que cada colônia fosse isolada propriamente. Todas as colônias isoladas foram analisadas via microscópio ótico com o auxílio da coloração de Gram para a confirmação do isolamento e a observação da sua coloração de Gram. Caso a presença de duas ou mais bactérias morfologicamente distintas fossem observadas, repiques e semeaduras de esgotamento foram realizadas novamente para isolar as colônias de maneira mais rigorosa.

Os isolados foram analisados pelo equipamento MALDI-TOF *Microflex Biotyper*, presente no Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Os isolados foram

preparados via semeadura de esgotamento em placas (60x15mm) de ágar cérebro-coração (BHI), sempre evitando que o tempo de cultivo ultrapassasse 24 horas. Isolados que não foram identificados ou que obtiveram um score baixo foram analisados novamente via extração proteica. Neste caso, os isolados foram preparados através da inserção de uma colônia do isolado em um microtubo (1,5mL) contendo 300µL de água Milli-Q e 900µL de etanol absoluto, seguido por homogeneização via vórtex.

Para a análise MALDI-TOF, o crescimento dos isolados foi colocado na placa metálica. 1µL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) é depositado sobre o crescimento, que seca em temperatura ambiente. Caso o isolado seja preparado via extração proteica, o microtubo contendo o isolado é centrifugado em 13000 RPM por 2 minutos, e o sobrenadante é descartado para repetir a centrifugação. O precipitado foi ressuspensionado em 50µL de ácido fórmico 70% e recebe 50µL de acetonitrila 100% antes de ser centrifugado em 13000 RPM por 2 minutos. 1µL do sobrenadante foi depositado na placa metálica, secado em temperatura ambiente. 1µL de HCCA foi adicionado sobre os isolados e secado da mesma forma.

A placa preparada foi inserida no espectrômetro de massa para a leitura, analisada via o software MALDI *Biotyper* 4.0 com configurações padrão. Considerou-se resultados com score ≥ 2 como indicadores de espécie, resultados com score 1.70-1.99 como indicadores de gênero, e resultados com score abaixo de 1.70 não eram compatíveis com qualquer registro na base de dados. Cada amostra propriamente identificada foi armazenada em uma solução de glicerol e *skim milk* para futuras análises.

Adicionalmente, alíquotas adicionais de cada frasco do modelo foram retiradas pela professora Marisa da Costa, docente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) da UFRGS, que também realizou análises via culturomica para isolamento de bactérias do grupo de actinomicetos. Os resultados obtidos pela sua análise foram adicionados a este estudo.

Como os resultados da primeira culturomica se mostraram pouco satisfatórios devido ao baixo número de colônias, ausência de crescimentos nas placas de ágar MacConkey e uma quantidade extremamente pequena de bactérias gram-negativas após a identificação pelo MALDI-TOF MICROFLEX, o experimento foi realizado uma segunda vez, seguindo todos os passos acima anteriormente

descritos, com algumas modificações. O MAO utilizado para a cultura das amostras foi elaborado somente com as soluções 1 e 2, excluindo a solução 3 contendo as substâncias antioxidantes; dois novos meios foram em conjunto com os anteriores (MRS, MacConkey, e MAO) para a realização da culturomica, ágar cistina lactose deficiente de eletrólitos (CLED) e um meio preparado para o isolamento de *Actinomyces* denominado ACTM (composto por caseína 2g/L, L-asparagina 0.1g/L, propionato de sódio 4g/L, fosfato dipotássio 0.5g/L, sulfato de magnésio 0.1g/L, sulfato de ferro II 0.001g/L e ágar 15g/L, pH final 8.1).

4.3 – Análise da resistência a antibióticos

Para verificar se os tratamentos favoreceram o aparecimento de populações resistentes, os crescimentos bacterianos após os tratamentos foram testados frente a antibióticos representantes de classes rotineiramente utilizadas na produção de suínos. Alíquotas de 2,0 ml de crescimento bacteriano de cada um dos 6 frascos do experimento dos tratamentos com prebióticos foram retiradas após 24 horas de incubação e inoculadas separadamente em grupos de 4 tubos Falcon 50 ml de caldo Mueller Hinton: frasco 1 com beta-lactâmicos (penicilina 2mg/L, amoxicilina 8mg/L); frasco 2 com aminoglicosídeos (gentamicina 8mg/L, estreptomicina 8mg/L); frasco 3 com ciprofloxacina 4g/L e frasco 4 foi o grupo controle, sem a adição de antibiótico. Após uma incubação de 18 horas à 35°C, o conteúdo de cada tubo foi diluído sequencialmente, até a concentração de 10^{-8} , as quais foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton e incubadas por 18 horas a 37°C até o crescimento visível de colônias. As inibições foram determinadas pelo cálculo de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) dos tratamentos em relação ao controle.

O teste de microdiluição foi realizado após a identificação dos isolados da culturômica através do MALDI-TOF, para verificar o perfil de suscetibilidade a antibióticos das cepas obtidos nos tratamentos, conforme CLSI 2019. Em uma microplaca de 96 poços de fundo em “U”, cada bactéria foi exposta a sete antibióticos representando diferentes classes (penicilina, ampicilina, ceftazidima, imipenem,

gentamicina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina) em uma faixa de concentração entre 512 a 0,25µg/ml (Figura 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ampicilina	A	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
Ceftazidima	B												
Ciprofloxacina	C												
Gentamicina	D												
Imipenem	E												
Ácido Nalidíxico	F												
Penicilina	G												
	H	C+	C+								C-	C-	

Figura 04 – Esquema demonstrando a organização das microplacas utilizadas para os testes de suscetibilidade à antibióticos. C+ e C- representam os controles positivos e negativos, respectivamente. As concentrações demonstradas são medidas em µg/ml

As cepas bacterianas foram preparadas com dois dias de antecedência. Cada cepa armazenada a -20°C foi semeada em ágar BHI e incubada por 22-24 horas a 37°C. As colônias resultantes foram semeadas em 1,3mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 22-24 horas. As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 21915 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controle da metodologia.

Os antibióticos ampicilina, ceftazidina, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, ácido nalidíxico e penicilina foram preparados conforme CLSI (2019). Para a preparação da microplaca, os poços foram preenchidos com 100µL de água destilada autoclavada. Em seguida cada antibiótico foi diluído de 512µg/mL a 0,25 µg/ml em seus respectivos poços (Figura 4). Posteriormente, cada poço recebeu 100µL de caldo Mueller Hinton Cátion ajustado 2x. Quatro poços na parte inferior da placa (H1, H2, H11 e H12) receberam 200µL de meio, sendo os controles positivos e negativos. 10µL de caldo Mueller Hinton cátion ajustado contendo o isolado foi adicionado a cada um dos poços contendo antibióticos, assim como nos poços de controle positivo. Cada placa foi incubada a 35°C por 20-22 horas.

Após o período de incubação, cada poço recebeu 12µL de corante indicadores de redox, como a resazurina (0,04%) ou cloreto de tetrazólio (TTC) (0,5%). Uma vez que todos os poços tivessem recebido o corante, as microplacas retornaram à estufa (35°C) por uma hora, e os resultados foram interpretados. Quando a resazurina foi utilizada, poços com a coloração violeta foram considerados sem crescimento bacteriano, e poços com a coloração rosa foram considerados com crescimento. No caso do TTC, poços sem coloração foram considerados sem crescimento, e poços com a coloração vermelha foram considerados com crescimento. O valor da concentração inibitória mínima foi estipulado a partir do primeiro poço que não apresentou crescimento, no sentido da direita para a esquerda.

Para uma melhor análise em nível populacional, foi realizado o cálculo da concentração inibitória mínima 50 (MIC₅₀) a partir dos resultados da CIM para cada espécie e determinado tratamento, correspondendo à concentração de antibiótico que inibe 50% da população testada.

4.4 - Análise estatística

A análise estatística dos resultados de culturomica foi realizada por softwares específicos. A diversidade das amostras foi calculada pelos índices de Simpson e Shannon (H') através do website *Omnicalculator*. Os valores utilizados foram o número de cada espécie identificada através da culturômica. Os dados de determinação do CIM por microdiluição em placa foram analisados utilizando o teste de Wincoxon para as médias de MIC₅₀ das espécies nos diferentes tratamentos.

4.4.1 – Análise da diversidade bacteriana por sequenciamento de alto rendimento.

A análise das populações bacterianas após o tratamento com prebióticos foi realizada através de técnicas convencionais de metagenômica. Três alíquotas de dois ml de crescimento bacteriano de cada frasco 12 horas após a aplicação dos tratamentos, foram retiradas e armazenadas em freezer -20°C. Para a extração do DNA foi utilizado o kit de extração QIAGEN *DNeasy PowerSoil*, seguindo as instruções do fabricante. A pureza do DNA extraído foi verificada via

espectrofotometria; amostras com valores insatisfatórios foram precipitadas pela adição de 225 μ L de acetato de amônio (3M) e centrifugação de 13000 RPM por 15 minutos.

O sequenciamento do gene 16S rRNA Foi realizado pela empresa *Illumina Inc.*, com principal foco nas regiões V3 e V4. Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento foram o 341F (5'-CCTACGGGGRSGCAGCAG-3') e o 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Wang et al., 2009; Caporaso et al., 2012). O sequenciamento foi realizado pelo kit V3 do sistema *MiSeq Sequencing* por *Illumina Inc.* (EUA). Para averiguar a qualidade dos dados, leituras brutas das sequências foram avaliadas pelo software *FastQC* (versão 0.11.8) (Andrews, 2010), e os dados resultantes foram depositados na base de dados NCBI SRA. Para analisar as sequências, foi utilizado a pipeline *Mothur* (versão 1.46.1) (Schloss et al., 2009). As sequências foram alinhadas e classificadas conforme sua taxonomia, utilizando a base de dados SILVA versão 138.1 como referência (Quast et al., 2013). Para a análise da diversidade, foi calculado os índices de alfa-diversidade, incluindo os índices de Simpson e Shannon, com base nos números de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Para averiguar diferenças estruturais potenciais entre as comunidades bacterianas foi realizada uma análise de variância (ANOVA) *two way* seguido pelo teste de Turkey nestes índices de diversidade. Os perfis taxonômicos foram visualizados em R utilizando os pacotes *reshape2*, *tidyverse* e *RColorBrewer*. Os gráficos foram construídos com dados de relativa abundância para fins de comparação (Chappidi et al., 2019).

5. RESULTADOS

5.1 - Análise culturômica

No total, foram obtidos 275 isolados a partir da análise via MALDI-TOF e, adicionalmente, as análises de culturômica realizadas pela professora Marisa da Costa identificaram 27 isolados. No total, foram identificados 32 microrganismos diferentes. Dos 302 isolados bacterianos identificados, cerca de 27% das espécies foram bactérias Gram-negativas. O grupo ILC apresentou o maior número de isolados bacterianos identificados (19,5%), e o grupo ILA apresentou o menor (11,6%). *Firmicutes* foi o principal filo encontrado (72%), seguido por *Proteobacteria* (27%) e *Actinobacteria* (1%) (Figura 5).

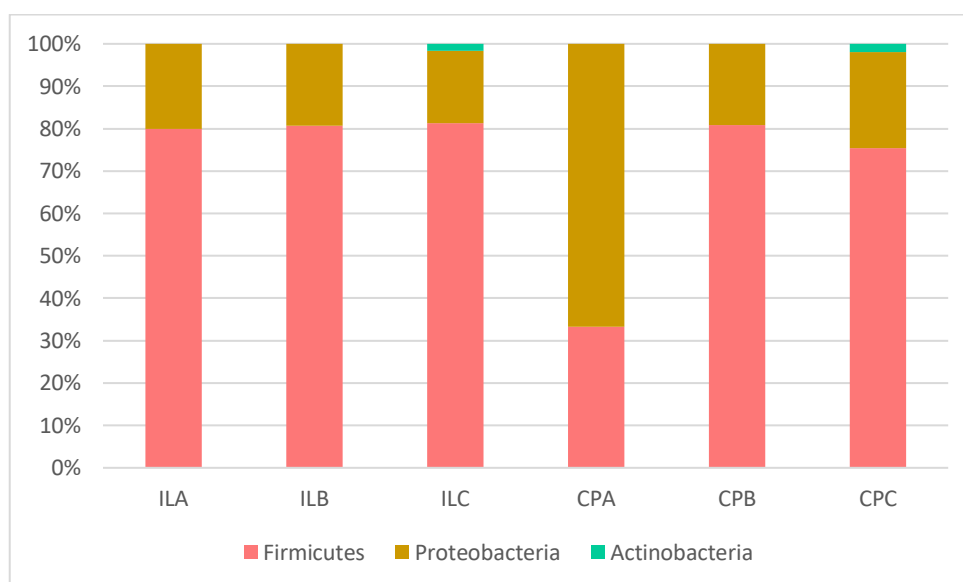


Figura 05 – Gráfico demonstrando os filos encontrados através das análises de culturômica. ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio; CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio.

No nível taxonômico de família, *Bacillaceae* e *Enterococcaceae* foram as famílias mais abundantes no grupo ILA (31,4% em ambos). Em ILB, *Bacillaceae* aumentou (45,6%) enquanto *Enterococcaceae* diminuiu (28%), mas em ILC ambos diminuíram (*Bacillaceae* 25,4%, *Enterococcaceae* 11,8%). No grupo CPA, a família mais abundante foi *Comamonadaceae* (37,2%), *Bacillaceae* foi menos abundante em comparação com o grupo íleo (25,5%) e *Enterococcaceae* estava completamente ausente. Em CPB, a família mais abundante foi *Clostridiaceae* (23,4%), nenhum

membro da família *Comamonadaceae* esteve presente, e *Bacillaceae* novamente sofreu uma redução (19,1%). Em CPC, a família mais abundante foi *Caryophanaceae* (39,6%), representado somente pela espécie *Rummeliibacillus pycnus* (Figura 6).

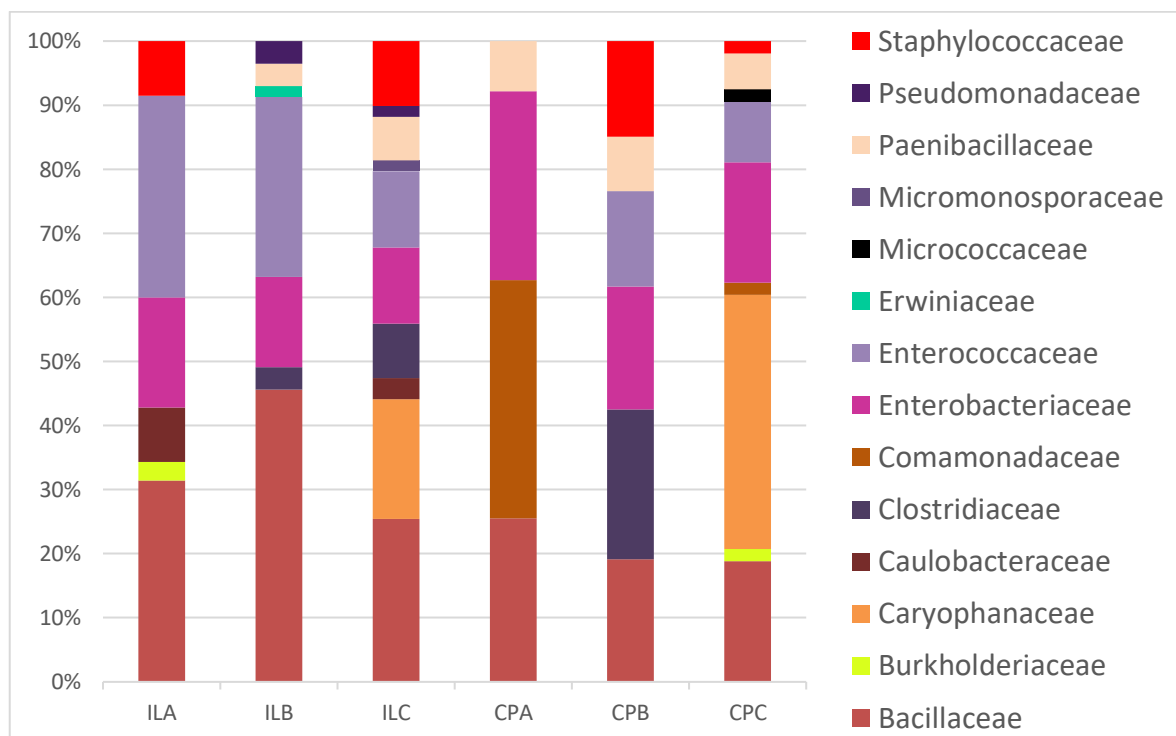


Figura 06 – Gráfico demonstrando as famílias encontradas nos diferentes grupos através de análise culturomica. ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio; CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio.

Dentre os isolados identificados, apenas as espécies *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* estiveram presentes em todos os grupos. As espécies mais abundantes foram *Enterococcus faecium* (13,5%), *Escherichia coli* (12,25%), *Rummeliibacillus pycnus* (10,5%), *Bacillus cereus* (8,9%) e *Clostridium tertium* (6,9%). *Rummeliibacillus pycnus* em particular somente esteve presente em grupos que receberam tratamento com ácido butírico (ILC e CPC). Este comportamento foi observado de maneira semelhante em *Lysinibacillus boronitolerans*, que somente esteve presente em grupos que receberam tratamento com MOS (ILB e CPB) (Tabela 1).

Quanto à análise de diversidade, ILC apresentou as maiores pontuações quanto à diversidade e uniformidade. Apesar de apresentar o menor número de indivíduos e o segundo menor número de espécies, ILA somente apresentou o

segundo menor valor de diversidade de Simpson, e o terceiro menor valor de diversidade de Shannon. ILA também apresentou o segundo maior valor de uniformidade. CPA apresentou os menores valores de diversidade (Tabela 2).

5.2 - Resultados da resistência a antibióticos

5.2.1 – Análise de suscetibilidade à antibióticos na população bacteriana

Nenhum dos grupos apresentou qualquer crescimento visível após o cultivo em meios contendo aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) e ciprofloxacina. Todos os grupos que não receberam antibiótico apresentaram crescimentos (ILA4, ILB4, ILC4, CPA4, CPB4 e CPC4). Entre os grupos dos tratamentos que receberam antibióticos (1 a 3) a densidade de crescimento foi mais alta nos que receberam tratamentos com prebióticos (ILB1). ILB foi o único grupo que apresentou crescimentos visíveis após o cultivo em beta-lactâmicos. No grupo controle do íleo (ILA), o grupo que recebeu beta-lactâmicos (ILA1) apresentou uma contagem cem vezes maior do que o grupo que não recebeu nenhum antibiótico (ILA4). Considerando os grupos que demonstraram crescimento na presença de beta-lactâmicos, o grupo que recebeu beta-lactâmicos (ILA1) apresentou uma contagem cem vezes maior do que o grupo que não recebeu nenhum antibiótico (ILA4); ILB1 apresentou uma contagem 99,96% menor do que ILB4; e CPA1 apresentou uma contagem 82,24% menor do que CPA4 (Tabela 03).

Tabela 01 – Resultados das análises de culturômica, e sua distribuição entre os diferentes tratamentos

	ILA	ILB	ILC	CPA	CPB	CPC	Total
Gram +							
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	-	2	4	4	4	3	17
<i>Bacillus altitudinis</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Bacillus badius</i>	-	5	1	3	2	2	13
<i>Bacillus cereus</i>	3	5	3	7	1	8	27
<i>Bacillus circulans</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	5	6	5	3	-	-	19
<i>Bacillus pumilus</i>	3	7	4	-	-	-	14
<i>Bacillus sonorensis</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	1	-	2	-	3
<i>Clostridium tertium</i>	3	2	5	-	11	-	21
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	4	-	4
<i>Enterococcus faecium</i>	11	16	7	-	3	3	40
<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	-	-	-	-	2	2
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	-	3	-	-	1	-	4
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	1	1
<i>Micromonospora chalcea</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	-	-	11	-	-	21	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	-	-	2	-	-	-	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	-	-	-	-	-	3
<i>Staphylococcus warneri</i>	-	-	3	-	7	1	11
Total	28	46	49	17	38	41	219
Gram -	ILA	ILB	ILC	CPA	CPB	CPC	Total
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	-	-	2	-	-	-	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	-	-	-	-	1	2
<i>Comamonas kerstersii</i>	-	-	-	19	-	1	20
<i>Escherichia coli</i>	5	6	4	10	3	9	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	2	-	-	2
<i>Pantoea sp</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2	3	3	6	1	16
<i>Pseudomonas koreensis</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas oryzae</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	1	-	-	-	1
Total	7	11	10	34	9	12	83

Tabela 02 – Índices de diversidade de Simpson e Shannon calculados a partir dos resultados da culturômica.

	ILA	ILB	ILC	CPA	CPB	CPC
Índice de diversidade de Simpson	0.85	0.88	0.93	0.8	0.9	0.8
Índice de diversidade de Shannon	1.97	2.24	2.63	1.79	2.34	1.9
Equidade	0.894	0.872	0.91	0.859	0.885	0.765
Riqueza	9	13	18	8	14	12
Número total de indivíduos	35	57	59	51	47	53

ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio; CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio.

Tabela 03 – Resultados dos testes de suscetibilidade à antibióticos no crescimento dos tratamentos ILA, ILB, ILC, CPA, CPB e CPC.

Alíquota	Contagem	Alíquota	Contagem
ILA1*	3,0x10 ¹³ UFC/ml	CPA1	1,03x10 ⁸ UFC/ml
ILA2	0	CPA2	0
ILA3	0	CPA3	0
ILA4	3,0x10 ¹¹ UFC/ml	CPA4	5,8x10 ⁸ UFC/ml
ILB1	5,9x10 ⁸ UFC/ml	CPB1	0
ILB2	0	CPB2	0
ILB3	0	CPB3	0
ILB4	1,39x10 ¹² UFC/ml	CPB4	8,7x10 ⁸ UFC/ml
ILC1	0	CPC1	0
ILC2	0	CPC2	0
ILC3	0	CPC3	0
ILC4	7,0x10 ⁸ UFC/ml	CPC4	4,7x10 ⁹ UFC/ml

*ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio; CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio. 1 = beta-lactâmicos; 2 = aminoglicosídeos; 3 = ciprofloxacina; 4 = grupo controle, sem antibiótico.

5.2.2 – Resultados da determinação da CIM dos isolados

Os resultados dos testes de microdiluição foram agrupados para a comparação dos valores entre os diferentes tratamentos utilizados. Os valores de CIM dos grupos que receberam tratamento (ILB, ILC, CPB e CPC) foram comparados com os valores de CIM dos grupos controle (ILA e CPA) para averiguar se os valores de CIM apresentaram redução com os tratamentos (Tabela 4). Devido à grande variação dos valores, o que dificultou a comparação, o MIC₅₀ foi calculado a partir dos valores obtidos pelos testes de CIM para cada espécie, a fim de permitir uma comparação mais precisa entre o perfil de resistência das populações bacterianas nos diferentes tratamentos e controles (Tabela 5). Quando comparados os valores de MIC₅₀, diferenças estatisticamente relevantes não foram observadas entre os níveis de resistência de ILA e ILB ($W = 6$; $p = 0,176$), de ILA e ILC ($W = 2$; $p = 0,043$), de CPA e CPB ($W = 13$; $p = 0,866$), ou de CPA e CPC ($W = 13$; $p = 0,866$).

Tabela 04 – Intervalo dos valores de concentração inibitória mínima para as espécies observadas nos diferentes tratamentos.

	A. aneurinilyticus	B. badius	B. cereus	B. pumilus	C. tertium	C. kerstersii	E. faecium	E. coli	P. mirabilis
ILA	n = 0	n = 0	n = 3	n = 3	n = 3	n = 0	n = 11	n = 5	n = 1
Amp	–	–	512	8	>512 – 1	–	64 – 2	>512 – 8	1
Cef	–	–	64	32 – 8	64 – 2	–	>512 – 512	512 – 1	512
Cip	–	–	2	2 – 0,25	128 – 0,25	–	256 – 128	128 – 0,5	2
Gen	–	–	0,5	8 – <0,25	32 – 4	–	512 – 32	64 – 4	16
Imi	–	–	1	256 – 0,5	>512 – 1	–	>512 – 8	>512 – 2	2
AcN	–	–	64	512 – 1	>512 – 32	–	>512 – 256	>512 – 64	64
Pen	–	–	128	2 – 0,5	512 – 1	–	64 – 2	>512 – 32	1
ILB	n = 2	n = 5	n = 5	n = 7	n = 2	n = 0	n = 16	n = 6	n = 2
Amp	64 – 32	>512 – 256	512 – 256	8	4 – 0,5	–	256 – 1	>512 – 2	>512 – 2
Cef	>512	>512 – 16	128 – 32	4	>512 – 32	–	>512 – 128	256 – 0,25	256 – 0,25
Cip	256	512 – 0,25	4 – 1	2	128 – 16	–	256 – 0,25	256 – 1	2 – 0,25
Gen	512 – 256	256 – 0,5	4 – 2	8	16	–	>512 – 1	32 – 2	128 – 2
Imi	128 – 64	512 – 32	16 – 8	64	64 – 16	–	>512 – 2	256 – 1	4 – 0,25
AcN	>512	>512 – 64	64	256	>512 – 512	–	>512 – 128	512 – 4	512 – 64
Pen	256	512 – 2	256 – 128	2	8	–	512 – 1	>512 – 8	512 – 4
ILC	n = 4	n = 1	n = 3	n = 4	n = 5	n = 0	n = 7	n = 4	n = 3
Amp	>512 – 4	>512 – 512	>512 – 4	>512	>512 – 2	–	>512 – 2	512 – 64	256 – 1

Cef	>512 – 256	8	64 – 16	>512 – 256	>512 – 4	–	512 – 0.25	2	>512 – 512
Cip	256 – 1	0.25	0.5 0.25	2	512 – 0.25	–	64 – 0.25	2 – 0,5	64 – 16
Gen	512 – 2	0.25	0.5 – 1	128	512 – 4	–	512 – 32	1 – 0,5	512 – 128
Imi	128 – 2	0.25	0.5 – <0.25	64 – 32	512 – 0.25	–	64 – 0.5	4 – 1	>512
AcN	>512 – 512	32	64 – 32	256	512 – 64	–	512 – 1	128	512 – 256
Pen	512 – 2	64	128 – 64	512	>512 – 4	–	256 – 1	512 – 128	>512
CPA	n = 4	n = 3	n = 7	n = 0	n = 0	n = 19	n = 0	n = 10	n = 3
Amp	>512 – 8	>512 – 8	>512 – 512	–	–	>512 – 64	–	>512 – 4	>512 128
Cef	512 – 4	512 – 64	64	–	–	>512 – 0.25	–	>512 – 0.25	>512 – 32
Cip	256 – 2	256 – 4	0.25	–	–	512 – 1	–	64 – 0.25	16 – <0,25
Gen	256 – 2	8	0.5	–	–	>512 – 0.25	–	512 – 2	64 – 16
Imi	512 – 0.5	256 – 16	0.5 – 1	–	–	512 – 0.25	–	16 – 0.5	512 – 4
AcN	>512 – 512	>512 – 512	32	–	–	>512 – 4	–	>512 – 32	512 – 2
Pen	>512 – 8	512 – 8	64	–	–	>512 – 64	–	>512 – 2	>512 128
CPB	n = 4	n = 2	n = 1	n = 0	n = 11	n = 0	n = 3	n = 3	n = 6
Amp	32 – 1	>512 – 4	>512	–	>512 – 1	–	256 – 16	16 – 0.5	>512 – 0.5
Cef	>512 – 64	>512 – 128	128	–	>512 – 2	–	>512 – 32	128 – 0.25	>512 – 2
Cip	256 – 0.5	256 – 2	0,5	–	128 – 0.25	–	512 – 32	64 – 1	128 – 0.25
Gen	256 – 1	256 – 8	1	–	>512 – 1	–	128 – 32	4	512 – 1
Imi	>512 – 1	256	0,25	–	>512 – 1	–	>512 – 32	256 – 0.5	>512 – 0.5
AcN	>512 – 64	512	32	–	>512 – 32	–	512 – 32	256 – 4	>512 – 4
Pen	256 – 16	256 – 8	256	–	>512 – 1	–	32 – 1	256 – 32	>512 – 8
CPC	n = 3	n = 2	n = 8	n = 0	n = 0	n = 1	n = 3	n = 9	n = 1
Amp	512 – 0.5	512 – 16	512 – 2	–	–	512	>512 – 2	>512	8
Cef	512 – 0.25	>512 – 512	64 – 2	–	–	>512	>512 – 0.25	32 – 4	512
Cip	4 – 0.25	256 – 32	4 – <0.25	–	–	64 – 32	64 – 0.25	256 – 0.25	128
Gen	4	>512 – 512	0.5 – 0.25	–	–	4	64 – 0.5	>512 – 2	256
Imi	1 – 0.5	512	0.25 – <0.25	–	–	32	64 – 1	128 – 0.5	4
AcN	128 – 32	512	32 – 1	–	–	512	>512 – 128	>512 – 32	512
Pen	128 – 0.25	16	256 – 2	–	–	64	512 – 2	>512 – 64	4

Tabela 05 – Comparação entre os valores de MIC₅₀ para as espécies dos diferentes tratamentos.

	A. aneurinilyticus	B. badius	B. cereus	B. pumilus	C. tertium	C. kerstersii	E. faecium	E. coli	P. mirabilis	Média MIC₅₀
ILA	n = 0	n = 0	n = 3	n = 3	n = 3	n = 0	n = 11	n = 5	n = 1	
Amp	–	–	512	8	>512	–	64	>512	1	438,83
Cef	–	–	64	32	64	–	>512	512	512	368
Cip	–	–	2	2	128	–	128	128	2	65
Gen	–	–	0,5	8	32	–	32	64	16	25,42
Imi	–	–	1	256	>512	–	32	128	2	240,5

AcN	-	-	64	512	>512	-	256	256	64	362,67
Pen	-	-	128	2	512	-	4	>512	1	278,5
ILB	n = 2	n = 5	n = 5	n = 7	n = 2	n = 0	n = 16	n = 6	n = 2	
Amp	64	512	512	8	4	-	256	>512	512	361,5
Cef	>512	>512	128	4	>512	-	>512	0,25	256	560,53
Cip	256	512	1	2	128	-	256	8	2	145,63
Gen	512	256	2	8	16	-	128	4	128	131,75
Imi	128	512	8	64	64	-	>512	64	4	233,5
AcN	>512	512	64	256	>512	-	>512	512	512	616
Pen	256	512	256	2	8	-	8	32	512	198,25
ILC	n = 4	n = 1	n = 3	n = 4	n = 5	n = 0	n = 7	n = 4	n = 3	
Amp	>512	>512	>512	>512	>512	-	>512	512	1	832,125
Cef	>512	8	64	>512	>512	-	512	2	512	521,25
Cip	256	0,25	0,5	2	32	-	16	0,5	64	46,41
Gen	512	0,25	0,5	128	512	-	32	1	512	212,22
Imi	128	0,25	>512	64	>512	-	64	1	>512	416,16
AcN	>512	32	64	256	512	-	512	128	512	380
Pen	256	64	64	512	512	-	32	128	>512	324
CPA	n = 4	n = 3	n = 7	n = 0	n = 0	n = 19	n = 0	n = 10	n = 3	
Amp	>512	>512	>512	-	-	512	-	>512	>512	938,67
Cef	512	512	64	-	-	>512	-	0,25	>512	522,71
Cip	2	256	0,25	-	-	4	-	32	>512	219,71
Gen	2	8	0,5	-	-	2	-	256	32	50,08
Imi	512	256	1	-	-	32	-	8	512	220,17
AcN	512	512	32	-	-	512	-	256	512	389,33
Pen	>512	512	64	-	-	128	-	>512	>512	629,33
CPB	n = 4	n = 2	n = 1	n = 0	n = 11	n = 0	n = 3	n = 3	n = 6	
Amp	1	>512	>512	-	>512	-	256	16	>512	624,15
Cef	64	>512	128	-	256	-	>512	128	>512	521,14
Cip	256	256	0,5	-	32	-	512	64	64	169,21
Gen	256	256	1	-	512	-	128	4	512	238,43
Imi	>512	256	0,25	-	512	-	>512	256	>512	585,18
AcN	64	512	32	-	512	-	512	256	>512	416
Pen	256	256	256	-	512	-	32	256	>512	370,28
CPC	n = 3	n = 2	n = 8	n = 0	n = 0	n = 1	n = 3	n = 9	n = 1	
Amp	512	512	512	-	-	512	>512	>512	8	586,28
Cef	>512	>512	2	-	-	>512	>512	8	512	659,71
Cip	128	256	>512	-	-	64	128	32	128	251,43
Gen	256	>512	0,25	-	-	4	512	8	256	294,32
Imi	128	512	>512	-	-	32	128	0,5	4	261,21
AcN	>512	512	32	-	-	512	>512	>512	512	662,86
Pen	128	16	256	-	-	64	512	>512	4	286,29

ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio; CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio.

Antibióticos utilizados: ampicilina (Amp), ceftazidima (Cef), ciprofloxacina (Cip), gentamicina (Gen), imipenem (Imi), ácido nalidíxico (AcN) e penicilina (Pen). “n” se refere ao número de indivíduos da espécie em cada grupo.

5.3 – Resultados das análises do sequenciamento de alto rendimento

Foi utilizado no total um conjunto de dados compostos por 346,430 sequências, agrupadas em um total de 15,065 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com o valor de dissimilaridade máxima de sequência de 3% para o gene 16S rRNA. As análises de alfa diversidade revelaram diferenças significantes: houve uma notável diferença entre os valores de Shannon dos tratamentos, Íleo ($F = 115,1$; $p < 0,0001$) e Cólon Proximal ($F = 153,0$; $p < 0,0001$), assim como os valores de Simpson (Íleo $F = 518,7$; $p < 0,0001$, Cólon Proximal $F = 33,08$; $p = 0,0006$). Estas diferenças foram observadas de forma consistente a partir da comparação dos grupos que receberam tratamento (ILB, ILC, CPB e CPC) com seus respectivos grupos controle (ILA e CPA). O número de espécies observadas em cada tratamento foram: ILA (2,943), ILB (3,212), ILC (3,876), CPA (3,123), CPB (2,636), e CPC (2,675) (Figuras 7 e 8).

No contexto de composição taxonômica dos tratamentos do grupo Íleo, o grupo controle ILA demonstrou uma predominância do filo *Firmicutes* (49.72%), seguido por *Proteobacteria* (29.84%) e *Bacteroida* (3.23%). O grupo ILB, por outro lado, foi dominado pelo filo *Proteobacteria* (44.72%), seguido por *Firmicutes* (37.16%) e *Bacteroidota* (9.38%). No grupo ILC, o filo *Proteobacteria* demonstrou a maior dominância sobre os outros filios (50.48%), enquanto *Firmicutes* e *Bacteroidota* apresentaram os menores valores dentre os tratamentos do grupo íleo (39.66% e 1.49%, respectivamente) (Figura 9).

Quanto aos tratamentos do grupo cólon proximal, o grupo controle (CPA) demonstrou uma predominância do filo *Firmicutes* (77.37%) com *Bacteroidota* e *Proteobacteria* em menores proporções (7.54% e 7.00%, respectivamente). No grupo CPB, as populações de *Firmicutes* e *Proteobacteria* diminuíram (57.37% e 4.94%, respectivamente) e as populações de *Bacteroidota* aumentaram (26.09%);

adicionalmente, as populações de *Actinobacteriase* tornaram mais prevalentes (7.70%). Finalmente, no grupo CPC, *Firmicutes* ainda foi o grupo dominante (55.61%), enquanto que o filo *Proteobacteria* apresentou um aumento de sua população (29.56%). *Actinobacteria* também se tornou mais predominante (5.40%) em comparação com *Bacteroida* (3.56%) (Figura 9).

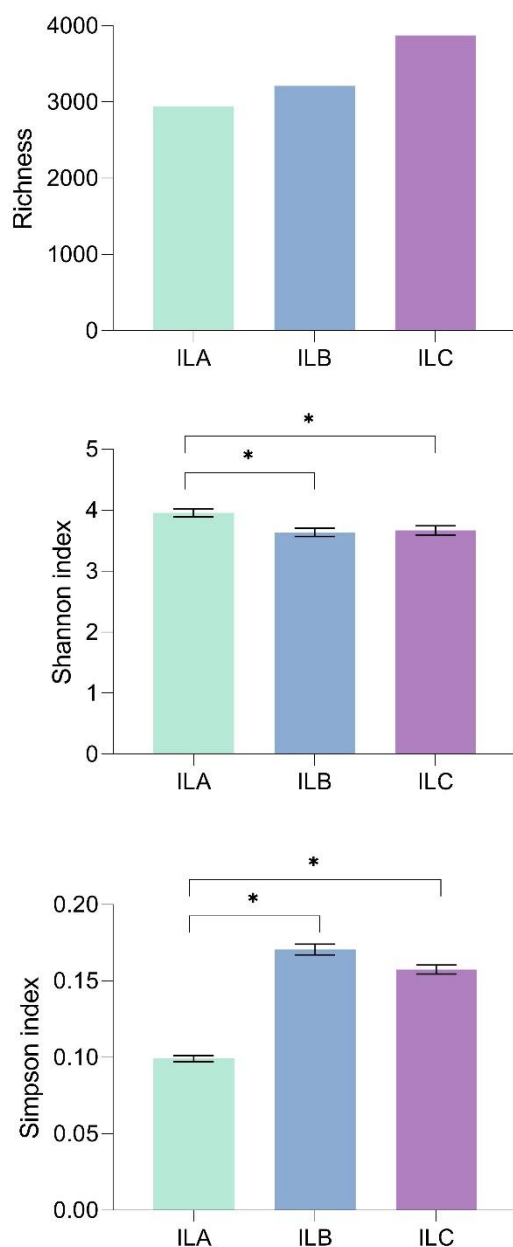


Figura 07 – Gráficos de alfa-diversidade dos grupos íleo. ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio.

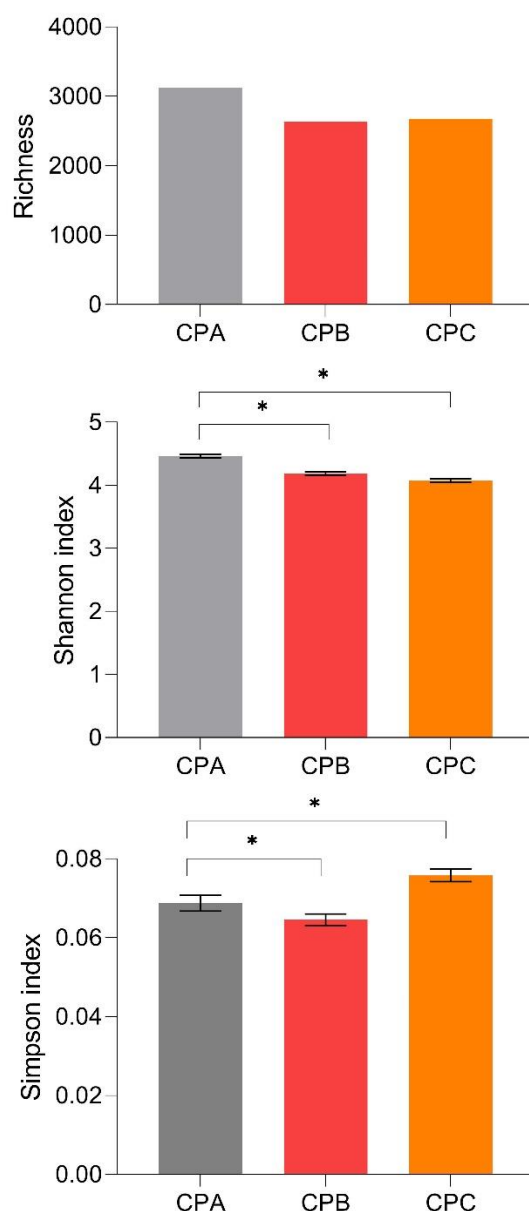


Figura 08 – Gráficos de alfa- diversidade dos grupos cólon proximal. CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio.

Em um nível taxonômico inferior, o grupo ILA demonstrou *Enterobacteriaceae* (25.03%) como a família dominante, seguido por *Acidaminococcaceae* (21.24%), *Lactobacillaceae* (7.09%) e *Desulfovibrionaceae* (6.48%). Isso foi observado de maneira semelhante no grupo ILB, *Enterobacteriaceae* sendo a família dominante novamente (40.76%), seguido por *Acidaminococcaceae* (11.68%), *Veillonellaceae* (6.84%) e *Desulfovibrionaceae* (1.66%). No grupo ILC, a família dominante foi *Comamonadaceae* (38.38%), enquanto os valores de abundância de *Enterobacteriaceae* foram reduzidos (10.63%). Adicionalmente,

Lactobacillaceae foram mais relevantes neste grupo (18.92%) (Figura9).

Nos grupos do cólon proximal, CPA apresentou *Acidaminococcaceae* como a família mais abundante (32.89%), seguido por *Lactobacillaceae* (10.41%). CPB, embora também predominado por *Acidaminococcaceae* (22.63%), demonstrou um aumento na abundância de *Prevotellaceae* (15.59%). No grupo CPC, *Lactobacillaceae* foi a família mais abundante (26.34%), seguido por *Enterobacteriaceae* (15.64%), *Comamonadaceae* (12.10%), e *Oscillospiraceae* (10.37%) (Figura 9).

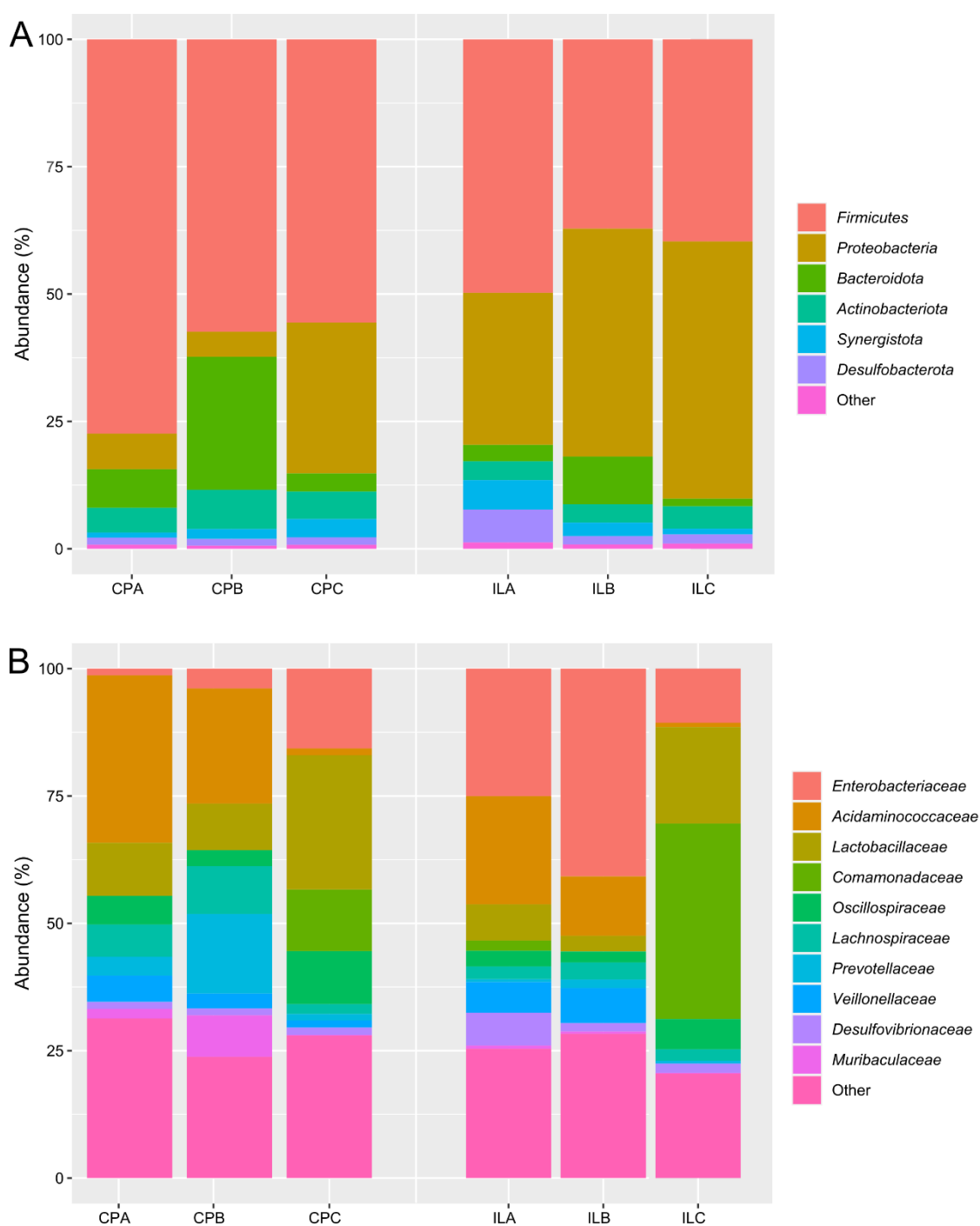


Figura 09 – Composição taxonômica dos tratamentos Íleo e Cólon Proximal, em nível de Filo (A) e Família (B). ILA: grupo íleo controle; ILB: grupo íleo + MOS; ILC: grupo íleo + butirato de sódio; CPA: grupo cólon proximal controle; CPB: grupo cólon proximal + MOS; CPC: grupo cólon proximal + butirato de sódio.

Para a análise em nível de gênero, foram exclusivamente considerados gêneros que apresentaram um valor de representação maior do que 4% dentre as amostras. Os resultados destas análises foram comparados e apresentados na Tabela 6 (grupo Íleo) e Tabela 7 (grupo Cólon Proximal).

Tabela 06 – Percentual em nível de gênero da abundância no grupo íleo.

	ILA	ILB	ILC
<i>Escherichia-Shigella</i>	24,58%	40,00%	10,34%
<i>Acidaminococcus</i>	20,42%	10,83%	0,14%
<i>Lactobacillus</i>	4,72%	1,84%	15,73%
Unclassified <i>Comamonadaceae</i>	2,00%	0	38,38%
<i>Bacteroides</i>	0,22%	5,62%	0,05%
<i>Megasphaera</i>	5,75%	6,56%	0

Tabela 07 – Percentual em nível de gênero da abundância no grupo cólon proximal

	CPA	CPB	CPC
<i>Escherichia-Shigella</i>	0	3,80%	15,35%
<i>Acidaminococcus</i>	31,03%	21,37%	0,11%
<i>Lactobacillus</i>	7,11%	5,68%	20,58%
Unclassified <i>Comamonadaceae</i>	0	0	12,10%
Unclassified <i>Succinivibrionaceae</i>	4,79%	0,62%	0,89%
<i>Bifidobacterium</i>	0,70%	5,34%	1,28%
<i>Muribaculaceae</i>	1,86%	8,09%	0,07%
<i>Prevotella</i>	0,79%	13,99%	0,01%
<i>Limosilactobacillus</i>	2,85%	3,11%	4,58%
Unclassified <i>Oscillospiraceae</i>	0,90%	0,48%	7,00%

6. DISCUSSÃO

A substituição de antibióticos como promotores de crescimento no setor agropecuário, a suplementação da metagenômica pela culturômica, a utilização de

modelos *in vitro* para a simulação de ambientes *in vivo* e a modulação da microbiota intestinal por probióticos são temas já explorados por diversos estudos anteriores. No entanto, há poucos artigos detalhando estes tópicos em conjunto, e estudos a respeito da influência do uso de antibióticos na modulação da suscetibilidade bacteriana a antibióticos são raros.

O presente estudo ofereceu a oportunidade de avaliar a viabilidade do uso de um modelo *in vitro* para a simulação do ambiente gastrointestinal suíno, e os possíveis efeitos do uso de MOS e ácido butírico, assim como alterações no perfil da suscetibilidade a antibióticos sobre a simulação de uma microbiota reconstituída a partir de fezes de leitões desmamados.

6.1 – Utilização de modelos *in-vitro*

A aplicabilidade dos modelos simulando o trato gastrointestinal suíno já foi previamente comprovada na simulação do processo de desmame na microbiota suína (Dufourny *et al*; 2019), os efeitos da utilização simultânea de probióticos e prebióticos sobre a microbiota suína (Tanner *et al*; 2014) e os efeitos da adição de parede celular de leveduras (Nakashimada *et al*; 2011). Estes artigos anteriores não relataram quaisquer dificuldades quanto ao cultivo da microbiota suína em modelos *in vitro*. O modelo *in vitro* elaborado a partir de modificações ao modelo utilizado por Dufourny *et al* (2019) permitiu a cultura de uma simulação da microbiota suína com sucesso.

Tanto a análise via culturomica como a metagenômica demonstraram que a microbiota intestinal suína é dominada pelos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*. Dufourny *et al* (2019) reportou uma maior abundância de filos menores (como *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*) em comparação a análises realizadas *in vivo*, onde *Firmicutes* e *Bacteroidetes* representam 90% dos filos presentes.

O modelo desenvolvido *in house* utilizado neste estudo careceu de componentes presentes no modelo baby–SPIME de Dufourny *et al*. (2019), como a conexão entre os compartimentos, o fluxo de conteúdo gástrico e utilização de nitrogênio para a manutenção do ambiente anaeróbico. Apesar disto, o modelo *in house* apresentou um desempenho similar e permitiu as diversas análises realizadas neste estudo.

É importante ressaltar que, apesar dos esforços de simular o ambiente gastrointestinal de maneira mais precisa possível, modelos *in vitro* atuais são incapazes de diretamente demonstrar os efeitos dos tratamentos sobre o organismo hospedeiro. Enquanto experimentos *in vitro* permitem a observação de tratamentos sobre a composição e comportamento da microbiota, a maioria dos estudos *in vivo* detalha os efeitos sobre o animal hospedeiro, dentre eles a estimulação do crescimento animal (Miguel *et al.*; 2004), fortalecimento das vilosidades intestinais (Poeikhampha *et al.* 2011), redução da inflamação sistêmica e regulação da função imune (Xudong *et al.*; 2019). Ainda assim, alterações na microbiota intestinal são correlacionadas com tais mudanças fisiológicas e, portanto, é possível estipular os possíveis efeitos dos resultados obtidos via modelos *in vitro* sobre o organismo hospedeiro.

6.2 – Análises metagenômica e culturômica da microbiota

A utilização em conjunto da metagenômica e culturômica foi proposta para aprimorar a identificação de populações microbianas. Embora a metagenômica permita uma análise mais detalhada de populações bacterianas, tais análises ainda apresentam desvantagens que impossibilitam a total identificação da microbiota intestinal. Dentre elas, o custo e tempo necessários para a realização das análises, a necessidade de altas quantidades de material genético de alta qualidade (Wang *et al.*; 2015), assim como uma incapacidade de identificar espécies em abundâncias abaixo do limite de detecção e suscetibilidade à lise incompleta de células durante o processo de extração ou amplificação por PCR inadequada (Wang *et al.*; 2021).

Os resultados das análises de culturômica demonstraram que *Firmicutes* e *Proteobacteria* foram os principais filos encontrados, enquanto os resultados das análises de metagenômica apresentam uma presença menor de *Proteobacteria* e a presença de *Bacteroidota*, que não foi encontrada pelas análises de culturômica. Esta discrepância entre os resultados foi observada de maneira semelhante em estudos por Wang *et al.* (2021) e Mun *et al.* (2021) que analisaram a microbiota de leitões *in vivo*. A culturômica foi somente capaz de detectar 3 filos, mas identificou 12 famílias que foram ignoradas pela análise de metagenômica (*Bacillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Caryophanaceae*, *Caulobacteraceae*, *Clostridiaceae*, *Enterococcaceae*, *Erwiniaceae*, *Micrococcaceae*, *Micromonosporaceae*, *Paenibacillaceae*,

Pseudomonadaceae e *Staphylococcaceae*). Por outro lado, a metagenômica identificou 8 famílias que não foram encontradas através da análise de culturômica (*Acidaminococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Dessulfovibrionaceae*, *Lachnospiraceae*, *Muribaculaceae*, *Oscillospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Vellonellaceae*). Estudos anteriores demonstram que a culturômica é capaz de contribuir de forma significativa para a análise da microbiota em conjunto com a metagenômica, demonstrando resultados onde 65% das espécies encontradas não são identificadas pela metagenômica (Mun *et al*; 2021).

Notavelmente, certos gêneros de interesse, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, não foram detectados através da culturômica no presente estudo, mesmo com a utilização do ágar MRS que favorece o crescimento de *Lactobacillus*. O cultivo de tais gêneros já foi demonstrado anteriormente em estudos que avaliam a culturômica (Mun *et al*; 2021). Outros estudos relatam populações de bactérias relevantes abaixo do esperado, mas nenhum relata uma total ausência como observado neste estudo: Dufourny *et al* (2019) observou poucas populações de *Bacilli* e *Lactobacillus*. Wang *et al* (2021), por outro lado, relatou que apenas metade dos isolados provenientes do ágar MRS foram *Lactobacillus*, e que 31% dos isolados provenientes deste ágar foram os gêneros *Escherichia* e *Streptococcus*, sugerindo que um meio com maior especificidade à *Lactobacillus* dever ser utilizado.

O presente estudo utilizou cinco meios de cultura (MAO, MacConkey, MRS, CLED e ACTM) com o intuito de oferecer condições amplas o suficiente para o cultivo e identificação do maior número de espécies diferentes possíveis. Mas a ausência de bactérias descritas por outros estudos que utilizaram métodos dependentes de cultura indica que a metodologia utilizada para a análise de culturômica deve ser reavaliada e outros métodos de enriquecimento e isolamento devem ser acrescentados. Possíveis adições à metodologia sugeridas pela bibliografia são um substrato de mucina sólida ao modelo, que auxiliaria no desenvolvimento das espécies ausentes (Dufourny *et al*; 2019), ou a utilização de ágar BSM, que é específico para *Bifidobacterium* (Wang *et al*, 2021).

Vale ressaltar a presença da espécie *Rumellibacillus pycnus*, que foi somente identificado através da culturômica e somente esteve presente nos grupos que receberam butirato de sódio (ILC e CPC). Nenhum estudo que detalha a microbiota suína ou a utilização de culturômica menciona tal espécie, e há pouca informação disponível a respeito desta espécie. As únicas características que foram

observadas neste estudo é a coloração Gram-positiva, a esporulação e a necessidade de butirato de sódio para o seu crescimento.

6.3 – Efeitos prebióticos de MOS e butirato de sódio

A utilização de prebióticos e seus efeitos sobre a saúde de animais já foram descritos em estudos utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, e demonstram resultados diferentes quanto à influência que os prebióticos exercem sobre a microbiota. Tanner *et al* (2014) não observou alterações em populações de espécies potencialmente benéficas (como *Lactobacilli* e *Bifidobacterium*) enquanto que Gainza *et al* (2020), Tiwari *et al* (2020) e Nakashimada *et al* (2011) reportam um aumento da abundância de tais espécies devido à utilização de prebióticos. O consenso geral dentre os estudos é de que a ação dos prebióticos demonstra resultados variados devido à diferença entre a metodologia utilizada por cada estudo. O estudo aqui descrito trouxe resultados variados, pode-se observar pela metagenômica que *Lactobacillus* foi reduzido pela ação de MOS mas aumentou na presença de butirato de sódio. *Bifidobacterium*, por outro lado, sofreu uma redução quando exposto à butirato de sódio, e aumentou na presença de MOS.

Conforme previamente mencionado, os MOS possuem a capacidade de interferir na aderência bacteriana ao epitélio intestinal através da ligação entre as fímbrias bacterianas tipo I e oligossacarídeos de manose encontrados na superfície do epitélio intestinal (Spring *et al*; 2000). Dentre as bactérias identificadas neste estudo, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* são potenciais portadores de tais fímbrias. As populações de *Escherichia coli* foram reduzidas drasticamente no grupo CPB, enquanto o grupo CPC apresentou um resultado similar ao grupo controle (CPA). Este efeito inibitório sobre *Escherichia coli* não foi observado no grupo íleo, sugerindo que um pH mais alcalino possa interferir na ação dos MOS. Tal influência do pH sobre o desempenho de prebióticos já foi observado na utilização de ácido butírico como um agente antibacteriano, que requer concentrações maiores para exercer seu efeito em pH acima de 5 (Sun *et al*; 2015).

Os prebióticos não são somente capazes de estimular o desenvolvimento de espécies benéficas, mas também demonstram um efeito inibitório sobre espécies patogênicas. Contudo, somente os grupos que receberam butirato de sódio apresentaram uma diminuição significativa de espécies patogênicas neste estudo. MOS levou à um aumento nas populações bacterianas de maneira geral. A única exceção foi *Escherichia coli*, que se demonstrou pouco afetada pelo butirato de sódio mas sofreu uma redução quando exposta à MOS no grupo cólon. Tal resistência foi observada de maneira semelhante por López–Colom *et al* (2020), que avaliou os efeitos de butirato de sódio sobre *Escherichia coli* em leitões. Embora os animais tenham apresentado uma modificação positiva no epitélio intestinal, as populações de *Escherichia coli* não foram alteradas significativamente. O efeito inibitório de MOS sobre bactérias patogênicas geralmente é somente eficaz contra bactérias portadoras de fímbria tipo I. A inibição de bactérias portadoras de fímbria foi observada em porcos (Tanner *et al*; 2014), aves (Pourabedin *et al*; 2014) e camarões (Gainza *et al*; 2020). Nakashimada *et al* (2011) oferece uma exceção, descrevendo uma redução de *Bacteroides fragilis* através do uso de parede celular de levedura e sugerindo que a inibição ocorre devido à inibição da absorção de glicose, galactose e arabinose. No entanto, *Bacteroides fragilis* é um portador de fímbrias (Wexler; 2007) e, portanto, é possível que a aglutinação por MOS também seja responsável pela inibição neste caso.

6.4 – Modulação da suscetibilidade a antibióticos na microbiota exposta a prebióticos

Atualmente existem poucos estudos que exploram a modulação da resistência microbiana a antibióticos, e ainda menos estudos que detalhem tal efeito a partir da utilização de substâncias prebióticas. Nenhum estudo especificamente detalhando os efeitos dos prebióticos sobre a resistência a antibióticos de uma população microbiana foi encontrado.

A microbiota cultivada através do modelo passou por dois testes de suscetibilidade a antibióticos, a fim de averiguar se os prebióticos utilizados (MOS e butirato de sódio) possuem algum efeito modulatório sobre às populações bacterianas resistentes. Preliminarmente, os resultados do teste de suscetibilidade

demonstraram que a adição dos prebióticos resultou em maiores valores de unidades formadoras de colônia por ml quando comparados aos grupos controle ILA e CPA nos grupos que não receberam antibióticos. Este estímulo de crescimento não necessariamente significa que os prebióticos favoreceram espécies resistentes, mas que os tratamentos auxiliaram no crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. A presença de crescimentos em ambos grupos ILA e CPA na presença de antibióticos beta-lactâmicos aponta que a microbiota original proveniente das amostras fecais (que não sofreram qualquer influência pelo MOS ou butirato de sódio) já possuíam espécies resistentes à esta classe de antibióticos. Apenas ILC, CPB e CPC não demonstraram crescimentos, sugerindo que os prebióticos exerceram uma influência sobre às populações resistentes. Embora o grupo CPB não tenha apresentado crescimentos, o grupo ILB demonstrou crescimentos na presença dos antibióticos beta-lactâmicos.

Os testes de CIM, por outro lado, demonstraram que o tratamento com prebióticos não alterou de maneira significativa o perfil de suscetibilidade da microbiota cultivada. Quando comparados aos grupos controles, os grupos que receberam tratamentos prebióticos demonstraram tanto diminuições quanto aumento dos valores de CIM, sendo possível observar modificações positivas nas CIM por comparações diretas. Todavia, as comparações estatísticas entre os resultados de MIC₅₀ não revelaram diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos controle e os grupos que receberam tratamento.

Wang T. *et al* (2021) desenvolveu um estudo para averiguar os efeitos de MOS sobre a microbiota de camarões *Litopenaeus vannamei*. Dentre os efeitos listados, houve uma redução nos genes de resistência e elementos genéticos móveis. O estudo utilizou reação em cadeia de polimerase quantitativo (qPCR) de alto rendimento para observar a influência do prebiótico sobre o perfil de suscetibilidade bacteriano, uma possível alternativa para estudos futuros.

7. CONCLUSÃO

O modelo *in house* utilizado foi capaz de recuperar populações bacterianas provenientes de amostras fecais suínas através da simulação do ambiente gastrointestinal, e permitiu a análise dos efeitos de prebióticos sobre a microbiota.

O uso da metagenômica e da culturomica em conjunto permitiu a montagem do perfil bacteriano da microbiota gastrointestinal suína simulada. E, apesar do fato que os resultados não foram completamente precisos, a culturomica pode ser facilmente modificada a partir da inclusão de meios de cultivo mais específicos para o isolamento de espécies de difícil cultivo.

MOS e butirato de sódio se demonstraram capazes de alterar as populações bacterianas presentes na microbiota simulada e reduzir certas espécies patogênicas.

E por fim, não foi possível comprovar o efeito destes prebióticos sobre a suscetibilidade da população bacteriana a antibióticos devido a resultados estatisticamente comprovados. Os testes de suscetibilidade sugerem um possível efeito quando pareados à agrupamentos de antibióticos, mas análises mais detalhadas são necessárias para obter respostas concretas.

8. REFERÊNCIAS

- Althouse C, Patterson S, Fedorka–Cray P, Isaacson RE. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6446–52. doi: 10.1128/IAI.71.11.6446–6452.2003. PMID: 14573666; PMCID: PMC219564.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arena MP, Caggianiello G, Fiocco D, Russo P, Torelli M, Spano G, Capozzi V. Barley β –glucans–containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *Int J Mol Sci.* 2014 Feb 20;15(2):3025–39. doi: 10.3390/ijms15023025. PMID: 24562330; PMCID: PMC3958897.
- Barszcz M, Taciak M, Skomial J. The effects of inulin, dried Jerusalem artichoke tuber and a multispecies probiotic preparation on microbiota ecology and immune status of the large intestine in young pigs. *Arch Anim Nutr.* 2016 Aug;70(4):278–92. doi: 10.1080/1745039X.2016.1184368. PMID: 27216555.
- Bian G, Ma S, Zhu Z, Su Y, Zoetendal EG, Mackie R, Liu J, Mu C, Huang R, Smidt H, Zhu W. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross–fostering model. *Environ Microbiol.* 2016 May;18(5):1566–77. doi: 10.1111/1462–2920.13272. Epub 2016 Mar 21. PMID: 26940746.
- Burger–van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, van Goudoever JB, van Seuningen I, Renes IB. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short–chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J.* 2009 May 13;420(2):211–9. doi: 10.1042/BJ20082222. PMID: 19228118.
- Castillo M, Martín–Orúe SM, Taylor–Pickard JA, Pérez JF, Gasa J. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *J Anim Sci.* 2008 Jan;86(1):94–101. doi: 10.2527/jas.2005–686. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17911238.
- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W. et al. Ultra–high–throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621–1624 (2012). <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Chappidi S, Villa EC, Cantarel BL. Using Mothur to Determine Bacterial Community Composition and Structure in 16S Ribosomal RNA Datasets. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2019 Sep;67(1):e83. doi: 10.1002/cpbi.83. PMID: 31524992.
- Dai X, Shen L. Advances and Trends in Omics Technology Development. *Front Med (Lausanne).* 2022 Jul 1;9:911861. doi: 10.3389/fmed.2022.911861. PMID: 35860739; PMCID: PMC9289742.
- Dou S, Gadonna–Widehem P, Rome V, Hamoudi D, Rhazi L, Lakhali L, Larcher T, Bahi–Jaber N, Pinon–Quintana A, Guyonvarch A, Huërou–Luron IL, Abdennebi–Najar L. Characterisation of Early–Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to

- Post-Weaning Diarrhoea. *PLoS One*. 2017 Jan 10;12(1):e0169851. doi: 10.1371/journal.pone.0169851. PMID: 28072880; PMCID: PMC5225014.
- Dubourg G, Lagier JC, Armougom F, Robert C, Hamad I, Brouqui P, Raoult D. The gut microbiota of a patient with resistant tuberculosis is more comprehensively studied by culturomics than by metagenomics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 May;32(5):637–45. doi: 10.1007/s10096-012-1787-3. Epub 2013 Jan 6. PMID: 23291779.
- Dufourny S, Everaert N, Lebrun S, Douny C, Scippo ML, Li B, Taminiou B, Marzorati M, Wavreille J, Froidmont E, Rondia P, Delcenserie V. Baby-SPIME: A dynamic in vitro piglet model mimicking gut microbiota during the weaning process. *J Microbiol Methods*. 2019 Dec;167:105735. doi: 10.1016/j.mimet.2019.105735. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31669849.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Background sources of meat**. New York, NY: FAO; 2014. Disponível em: <https://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html>. Acesso em: 11 de jan. 2022.
- Frese, S.A., Parker, K., Calvert, C.C. et al. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3, 28 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0091-8>
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446–50. doi: 10.1038/nature12721. Epub 2013 Nov 13. Erratum in: *Nature*. 2014 Feb 13;506(7487):254. PMID: 24226770.
- Gainza O, Romero J. Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador. *Sci Rep*. 2020 Feb 17;10(1):2719. doi: 10.1038/s41598-020-59587-y. PMID: 32066764; PMCID: PMC7026423.
- Garcia Diaz T, Ferriani Branco A, Jacovaci FA, Cabreira Jobim C, Pratti Daniel JL, Iank Bueno AV, Gonçalves Ribeiro M. Use of live yeast and mannan-oligosaccharides in grain-based diets for cattle: Ruminal parameters, nutrient digestibility, and inflammatory response. *PLoS One*. 2018 Nov 14;13(11):e0207127. doi: 10.1371/journal.pone.0207127. PMID: 30427904; PMCID: PMC6241129.
- Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol*. 2002 May;13(1):29–42. doi: 10.1081/ABIO-120005768. PMID: 12212942.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995 Jun;125(6):1401–12. doi: 10.1093/jn/125.6.1401. PMID: 7782892.
- Hartl DL, Dykhuizen DE. The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*. 1984;18:31–68. doi: 10.1146/annurev.ge.18.120184.000335. PMID: 6099090.
- Henze LJ, Koehl NJ, Jansen R, Holm R, Vertzoni M, Whitfield PD, Griffin BT.

- Development and evaluation of a biorelevant medium simulating porcine gastrointestinal fluids. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Sep;154:116–126. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.06.009. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32580049.
- Hopfner F. et al. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. *Brain Res.* 2017 Jul 15;1667:41–45. doi: 10.1016/j.brainres.2017.04.019
- Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients.* 2015 Apr 14;7(4):2839–49. doi: 10.3390/nu7042839. PMID: 25875123; PMCID: PMC4425176.
- Kogan G.; Kocher A. (2007). Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection, 109(1–3), 0–165. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.134
- Kongsted, H., Stege, H., Toft, N. et al. The effect of New Neonatal Porcine Diarrhoea Syndrome (NNPDS) on average daily gain and mortality in 4 Danish pig herds. *BMC Vet Res* 10, 90 (2014). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-90>
- Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):237–64. doi: 10.1128/CMR.00014-14. PMID: 25567229; PMCID: PMC4284300.
- Liang, J., Kou, S., Chen, C. et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, metabonomics and intestinal microbial differences of weaned piglets. *BMC Microbiol* 21, 85 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02143-z>
- Liu H, Zeng X, Zhang G, Hou C, Li N, Yu H, Shang L, Zhang X, Trevisi P, Yang F, Liu Z, Qiao S. Maternal milk and fecal microbes guide the spatiotemporal development of mucosa-associated microbiota and barrier function in the porcine neonatal gut. *BMC Biol.* 2019 Dec 18;17(1):106. doi: 10.1186/s12915-019-0729-2. PMID: 31852478; PMCID: PMC6921401.
- López-Colom P, Castillejos L, Rodríguez-Sorrento A, Puyalto M, Mallo JJ, Martín-Orúe SM. Impact of in-feed sodium butyrate or sodium heptanoate protected with medium-chain fatty acids on gut health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* F4. *Arch Anim Nutr.* 2020 Aug;74(4):271–295. doi: 10.1080/1745039X.2020.1726719. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32108496.
- van der Meulen J, Koopmans SJ, Dekker RA, Hoogendoorn A. Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. *Animal.* 2010 Oct;4(10):1653–61. doi: 10.1017/S1751731110001011. PMID: 22445118.
- Miguel JC, Rodríguez-Zas SL, Pettigrew JE. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos®) for improving nursery pig performance. *J Swine Health Prod.* 2004;12(6):296–307.
- Mun D, Kim H, Shin M, Ryu S, Song M, Oh S, Kim Y. Decoding the intestinal microbiota repertoire of sow and weaned pigs using culturomic and metagenomic approaches. *J Anim Sci Technol.* 2021 Nov;63(6):1423–1432. doi: 10.5187/jast.2021.e124. Epub 2021 Nov 30. PMID: 34957455; PMCID: PMC8672247.
- Nakashimada Y, Michinaka A, Watanabe K, Nishio N, Fujii T. Brewer's yeast cell wall affects microbiota composition and decreases *Bacteroides fragilis* populations in an anaerobic gut intestinal model. *J Biosci Bioeng.* 2011 Feb;111(2):178–84. doi:

- 10.1016/j.jbiosc.2010.09.005. Epub 2010 Oct 6. PMID: 20926339.
- Nobuyuki S. (2019). Biogenic Amines: Signals Between Commensal Microbiota and Gut Physiology. *Frontiers in Endocrinology*, 10(), 504–. doi:10.3389/fendo.2019.00504
- Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*. 2012 Apr 27;336(6080):489–93. doi: 10.1126/science.1219328.
- Paola López-Colom, Lorena Castillejos, Agustina Rodríguez-Sorrento, Mónica Puyalto, Juan José Mallo & Susana M. Martín-Orúe (2020) Impact of in-feed sodium butyrate or sodium heptanoate protected with medium-chain fatty acids on gut health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* F4+, *Archives of Animal Nutrition*, 74:4, 271–295, DOI: 10.1080/1745039X.2020.1726719
- Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol*. 2012 Jan;30(1):17–25. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.011. Epub 2011 Jul 20. PMID: 21764163.
- Philip Hugenholtz; Norman R. Pace (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. , 14(6), 190–197. doi:10.1016/0167-7799(96)10025-1
- Pluske JR. Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J Anim Sci Biotechnol*. 2013 Jan 7;4(1):1. doi: 10.1186/2049-1891-4-1. PMID: 23289727; PMCID: PMC3623743.
- Poeikhampha, T., & Bunchasak, C. (2011, April 28). 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 Sciences*. Asian Australasian Association of Animal Production Societies. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10334>
- Posadas, G. A., Broadway, P. R., Thornton, J. A., Carroll, J. A., Lawrence, A., Corley, J. R., Thompson, A & Donaldson, J. R. (2017). Yeast pro- and paraprobiotics have the capability to bind pathogenic bacteria associated with animal disease. *Translational Animal Science*, 1(1), 60–68.
- Pourabedin M, Xu Z, Baurhoo B, Chevaux E, Zhao X. Effects of mannan oligosaccharide and virginiamycin on the cecal microbial community and intestinal morphology of chickens raised under suboptimal conditions. *Can J Microbiol*. 2014 May;60(5):255–66. doi: 10.1139/cjm-2013-0899. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24766220.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Opens external link in new windowNucl. Acids Res*. 41 (D1): D590–D596.
- Qi R, Qiu X, Du L, Wang J, Wang Q, Huang J, Liu Z. Changes of Gut Microbiota and Its Correlation With Short Chain Fatty Acids and Bioamine in Piglets at the Early Growth Stage. *Front Vet Sci*. 2021 Jan 5;7:617259. doi: 10.3389/fvets.2020.617259. PMID: 33469555; PMCID: PMC7813758.
- Saeed, Muhammad & Ahmad, Fawwad & Arain, Muhammad & Abd El-Hack, Mohamed & Emam, Mohamed & Bhutto, Zohaib & Moshaveri, Arman. (2017). Use of Mannan-Oligosaccharides (MOS) As a Feed Additive in Poultry Nutrition. 7. 94–103.

- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Dec;75(23):7537–41. doi: 10.1128/AEM.01541–09. Epub 2009 Oct 2. PMID: 19801464; PMCID: PMC2786419.
- Shin D, Chang SY, Bogere P, et al. Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs. *PLoS One.* 2019;14(8):e0220843. Published 2019 Aug 28. doi:10.1371/journal.pone.0220843
- Simpson CA et al. Feeling down? A systematic review of the gut microbiota in anxiety/depression and irritable bowel syndrome. *J Affect Disord.* 2020 Apr 1;266:429–446. doi: 10.1016/j.jad.2020.01.124. Epub 2020 Jan 22. PMID: 32056910.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI–TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791. Published 2015 Aug 5. doi:10.3389/fmicb.2015.00791
- Tang et al. “Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis.” *The Lancet. Planetary health* vol. 1,8 (2017): e316–e327. doi:10.1016/S2542–5196(17)30141–9
- Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella–challenged broiler chicks. *Poult Sci.* 2000 Feb;79(2):205–11. doi: 10.1093/ps/79.2.205. PMID: 10735748.
- Sun CQ, O'Connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. *Chem Biol Interact.* 1998 May 15;113(2):117–31. doi: 10.1016/s0009–2797(98)00025–8. PMID: 9717513.
- Sun W, Sun J, Li M, Xu Q, Zhang X, Tang Z, Chen J, Zhen J, Sun Z. The effects of dietary sodium butyrate supplementation on the growth performance, carcass traits and intestinal microbiota of growing–finishing pigs. *J Appl Microbiol.* 2020 Jun;128(6):1613–1623. doi: 10.1111/jam.14612. Epub 2020 Mar 1. PMID: 32048746.
- Tanner SA, Chassard C, Zihler Berner A, Lacroix C. Synergistic effects of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and selected prebiotics on inhibition of *Salmonella* colonization in the swine proximal colon PolyFermS model. *Gut Pathog.* 2014 Oct 24;6(1):44. doi: 10.1186/s13099–014–0044–y. PMID: 25364390; PMCID: PMC4215022.
- Tiwari UP, Fleming SA, Abdul Rasheed MS, Jha R, Dilger RN. The role of oligosaccharides and polysaccharides of xylan and mannan in gut health of monogastric animals. *J Nutr Sci.* 2020 Jun 15;9:e21. doi: 10.1017/jns.2020.14. PMID: 32595966; PMCID: PMC7303790.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser–Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804–810.

- doi:10.1038/nature06244
- Vallianou NG, Stratigou T, Tsagarakis S. Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. *Hormones (Athens)*. 2019 Jun;18(2):141–144. doi: 10.1007/s42000–019–00093–w.
- Wang T, Yang J, Lin G, Li M, Zhu R, Zhang Y, Mai K. Effects of Dietary Mannan Oligosaccharides on Non–Specific Immunity, Intestinal Health, and Antibiotic Resistance Genes in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Front Immunol*. 2021 Nov 24;12:772570. doi: 10.3389/fimmu.2021.772570. Erratum in: *Front Immunol*. 2022 Sep 12;13:1015734. PMID: 34899725; PMCID: PMC8652215.
- Wang X, Howe S, Wei X, Deng F, Tsai T, Chai J, Xiao Y, Yang H, Maxwell CV, Li Y, Zhao J. Comprehensive Cultivation of the Swine Gut Microbiome Reveals High Bacterial Diversity and Guides Bacterial Isolation in Pigs. *mSystems*. 2021 Aug 31;6(4):e0047721. doi: 10.1128/mSystems.00477–21. Epub 2021 Jul 20. PMID: 34282935; PMCID: PMC8407297.
- Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, Zheng SS. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol*. 2015 Jan 21;21(3):803–14. doi: 10.3748/wjg.v21.i3.803. PMID: 25624713; PMCID: PMC4299332.
- Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009 Oct 9;4(10):e7401. doi: 10.1371/journal.pone.0007401. PMID: 19816594; PMCID: PMC2754607.
- Wang Z. et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011 Apr 7;472(7341):57–63. doi: 10.1038/nature09922.
- Wexler, H. M. (2007). *Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty–Gritty*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 593–621. doi:10.1128/cmr.00008–07
- Xudong Duan, Gang Tian, Daiwen Chen, Linhui Huang, Dan Zhang, Ping Zheng, Xiangbing Mao, Jie Yu, Jun He, Zhiqing Huang, Bing Yu, Mannan oligosaccharide supplementation in diets of sow and (or) their offspring improved immunity and regulated intestinal bacteria in piglet, *Journal of Animal Science*, Volume 97, Issue 11, November 2019, Pages 4548–4556, <https://doi.org/10.1093/jas/skz318>
- Zhang Y. et al. Target Intestinal Microbiota to Alleviate Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin Ther*. 2017 Feb;39(2):322–336. doi: 10.1016/j.clinthera.2016.12.014.