

Efeito do uso de aditivos a base de microrganismos vivos na dieta de leitões na fase de creche

Effect of additives live microorganisms-based in the diet of piglets in the nursery phases

DOI:10.34117/bjdv7n10-296

Recebimento dos originais: 07/09/2021

Aceitação para publicação: 21/10/2021

Leticia Veiga Rodrigues

Graduanda em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
PUCPR campus Toledo, Paraná, Brasil.

Avenida União 500, Vila Becker, Toledo, Paraná, Brasil.

E-mail: leticiaveigar@hotmail.com

Mariana Ornaghi

Doutora em Zootecnia.

Safeeds Nutrição Animal, Rod. BR 467, Rua Marginal, n° 21, Cascavel, Brasil.

E-mail: mariana.ornaghi@safeeds.com.br

Caio Henrique Ferreira

Graduado em Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
PUCPR campus Toledo, Paraná, Brasil.

Avenida União 500, Vila Becker, Toledo, Paraná, Brasil.

E-mail: henrique.caio.f@gmail.com

Caio Tellini

Médico Veterinário.

Safeeds Nutrição Animal, Rod. BR 467, Rua Marginal, n° 21, Cascavel, Brasil.

E-mail: caio.tellini@safeeds.com.br

Maigel Dreyer

Zootecnista.

Safeeds Nutrição Animal, Rod. BR 467, Rua Marginal, n° 21, Cascavel, Brasil.

E-mail: maigel.dreyer@safeeds.com.br

Ricardo Araújo Castilho

Mestre em Zootecnia.

Safeeds Nutrição Animal, Rod. BR 467, Rua Marginal, n° 21, Cascavel, Brasil.

E-mail: ricardo.castilho@safeeds.com.br

Everson Zotti

Professor Doutor em Medicina Veterinária.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR campus Toledo, Paraná, Brasil.

Avenida União 500, Vila Becker, Toledo, Paraná, Brasil.

E-mail: everson.zotti@safeeds.com.br

RESUMO

Os aditivos a base de DFM (*direct fed microbials*) são microrganismos vivos utilizados para melhorar a saúde e performance dos animais. Através do uso de DFM na ração, resultados superiores na produtividade, conversão alimentar e ganho de peso tem sido relatados. A introdução de suplementos a base de DFM contribui para a modulação da microbiota e aumento na resposta imune após períodos de estresse como o desmame de leitões. O objetivo do estudo foi avaliar o desempenho animal em uma granja no oeste do Paraná, utilizando o produto a base de DFM (*Bacillus subtilis*; 100 g/ton) na dieta de leitões nas fases de creche (Pré 1, Pré 2, Inicial 1 e Inicial 2) em substituição a utilização de altas doses de antibióticos (amoxicilina, colistina, clortetraciclina, trimetropim e sulfametazina) na ração dos animais. Neste estudo, o aditivo proporcionou maior ganho de peso dos animais em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$).

Palavras-chave: Aditivos, *Bacillus subtilis*, DFM, Leitões, Microrganismos.

ABSTRACT

DFM (direct fed microbials) are live microorganisms that can improve the health and performance of animals. Through the use of DFM in feed, improved results in productivity, feed conversion and weight gain have been reported. DFM-based supplements contribute to the modulation of the microbiota and increased immune response after periods of stress such as weaning of piglets. The aim of the study was to evaluate animal performance in a commercial farm in western Paraná, Brazil, using the DFM-based product (*Bacillus subtilis*; 100 g/ton) in the diet of piglets in the nursery stages (Pre 1, Pre 2, Initial 1 and Initial 2) replacing the use of high doses of antibiotics (amoxicillin, colistin, chlortetracycline, trimethoprim and sulfamethazine) in the animal feed. In this study, the additive provided greater weight gain of animals compared to the control group.

Keywords: Additives, *Bacillus subtilis*, DFM, Piglets, Microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

O uso de antimicrobianos promotores de crescimento na alimentação de suínos tem sido relatado desde a década de 50, sendo utilizados de maneira profilática e terapêutica (Gavioli et al., 2013). Entretanto, com a utilização contínua de antibióticos na alimentação animal surgiu uma grande preocupação da sociedade, em relação a indução a resistência antimicrobiana e cruzada tendo risco a saúde pública, acarretando assim, restrições quanto ao seu uso (Gonzales et al., 2012).

A utilização de promotores de crescimento eubióticos passou a ganhar espaço na ciência e na indústria. Esses aditivos se destacam por não desencadear fatores de resistência bacteriana, sendo utilizados de maneira profilática contra patógenos ou como promotores de crescimento melhorando desempenho zootécnico (Junqueira et al., 2009).

A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental frente a reações bioquímicas do animal, e, quando em equilíbrio, impede que agentes patógenos atuem e desempenhem seus efeitos indesejáveis no hospedeiro (Ziemer & Gibson, 1998). A manipulação da microbiota intestinal pode ser realizada através do uso de aditivos como DFM (*direct fed microbials*), probióticos, enzimas, ácidos orgânicos, prebióticos, dentre outros (Sezen, 2013).

O FDA (Food and Drug Administration) recomenda que o termo probiótico, assim como FMT (Transplante de Microbiota Fecal) sejam usados na nutrição humana e que o termo DFM seja utilizado na alimentação animal. Atualmente o termo probiótico é usado de forma intercambiável na alimentação humana e animal em todo o mundo. Os aditivos a base de DFM são considerados hospedeiro-específicos, sendo microrganismos vivos que melhoram a saúde e performance dos animais (Bastos et al., 2020). Esses microrganismos possuem a capacidade de adesão e proliferação no epitélio intestinal, contribuindo beneficentemente com a microbiota do hospedeiro (Moraes, 2008).

Os *direct fed microbials* realizam exclusão competitiva com bactérias patógenas por sítios de ligação no epitélio intestinal (Nurmi & Rantala, 1973), produção de substâncias como bacteriocinas e promovem equilíbrio da microbiota benéfica entérica (Butolo, 2002). A colonização de microrganismos benéficos pode modular beneficentemente a microbiota intestinal, melhorando a capacidade de absorção e digestão de nutrientes. Esses microrganismos benéficos competem com agentes patógenos por locais de adesão no epitélio intestinal, impossibilitando a adesão e multiplicação (Pollmann et al., 1980), bloqueando a ligação e impedindo assim, possíveis infecções (Umesaki et al., 1997). Efeitos positivos com o uso de DFM são observados na nutrição dos animais, visto que atuam beneficentemente na interação com os sais biliares e produzem maior quantidade de vitaminas (Yirga, 2015).

No período de desmame múltiplos fatores estressantes são desencadeados aos leitões, devido a mudanças no ambiente, dieta e agentes patogênicos, que podem ocasionar queda na imunidade e desempenho. A suplementação a base de DFM possui a capacidade de modular a resposta imunitária e a saúde dos animais após períodos com altas cargas de estresse (Buntyn et al., 2016).

O uso de DFM/probióticos proporciona benefícios ao hospedeiro, e deve ser utilizado de forma contínua em decorrência da ocupação de lactobacilos naturalmente adquiridos presentes na microbiota intestinal, que dificultam a permanente aderência frente a microbiota adquirida. Sendo assim, é necessário a escolha de cepas que possuem

capacidade contínua de metabolização e ação probiótica, com capacidade de aderência, crescimento na microbiota, e, antagonismo bacteriano. Características como, presença de células viáveis, ausência de ação patogênica com efeitos adversos e resistência ao pH, são fatores que caracterizam o DFM como um bom aditivo para os animais, sobretudo suínos (Fuller, 1989).

Alguns aditivos a base de DFM, possuem capacidade bactericida ou bacteriostática, que inibem a colonização de agentes indesejáveis no intestino, como bactérias gram-negativas e gram-positivas. Atuam no intestino como antagonistas de microrganismos patogênicos, neutralizando a microbiota do animal, possibilitando um bom estado de eubiose, com maior diversidade de bactérias benéficas e defesa imunológica (Bajagai et al., 2016).

Os principais microrganismos a base de DFM/probióticos onde atuam colonizando o trato gastrointestinal, sendo capazes de sobreviver frente a condições adversas presentes na microbiota do animal (Gomes, 2016). Bactérias como *Bacillus subtilis* possuem a capacidade de reduzir a produção e concentração de amônia nas fezes, proporcionando melhor saúde, maior crescimento e aproveitamento de proteínas aos animais (Opalinski et al., 2007).

DFMs em suínos, proporcionaram maior ganho de peso, qualidade da carcaça, conversão alimentar e diminuição de casos de mortalidade e morbidade relacionados a episódios de diarreia por *E. coli* em leitões desmamados (Alexopoulos et al., 2004). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho animal, utilizando o produto a base de DFM a base de *Bacillus subtilis* nas dietas de leitões em fase de creche em substituição a utilização de altas doses de antibióticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma granja produtora de leitões (UPL), com 960 matrizes localizada na região oeste do Paraná. Foram utilizados 234 leitões provenientes de 46 fêmeas da genética Topigs (TN 70), com diferentes ordens de parto. A idade média dos leitões desmamados foram de 21 ± 2 dias e o peso médio inicial de $5,20 \pm 1,09$ kg.

Todos os leitões foram vacinados no momento do desmame com as seguintes vacinas: Autógena (Ipeve) para *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* e *Streptococcus suis*; Circovírus suíno tipo 2 (PCV2; Circoflex) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Respisure1). Os lotes desmamados em cada semana foram alojados em baias coletivas.

A alimentação dos leitões foi farelada, ofertada à vontade e dividida em 4 fases conforme volume em kg e tempo de consumo por leitão sendo: Pré inicial 1 - 1 kg/ leitão e tempo de consumo de 5 dias; Pré inicial 2 - 3 kg/ leitão e tempo de consumo de 6 dias; Inicial I: 8 kg/ leitão e tempo de consumo de 14 dias; Inicial 2: 11 kg/ leitão e tempo de consumo médio de 12-15 dias (Tabela 1). A ração fornecida aos animais é de produção própria da granja, com exceção as rações destinadas a fase de Pré 1 e Pré 2, sendo estas, fornecidas por uma empresa de Nutrição Animal. Os leitões foram desmamados, pesados individualmente, brincados e distribuídos aleatoriamente em cada tratamento sendo estes: ATB5 = contendo cinco antibióticos durante todas as fases de creche (amoxicilina, colistina, clortetraciclina, trimetropim e sulfametazina) e DFM = na dosagem de 100 g/ton (Safeeds Nutrição Animal Ltda) combinado com cinco drogas nas fases Pré 1 e 2, posteriormente na Inicial 1 e 2 foram retirados os quatro antibióticos e utilizado somente amoxicilina (Tabela 1 e 2).

Durante cada troca de fase os leitões eram pesados individualmente para análise de desempenho posterior. Os leitões de cada tratamento permaneceram juntos até atingir o tempo de creche de 46 dias e o peso médio de 19,36 kg.

Todos os leitões receberam alimentação a vontade, seguindo as recomendações mínimas estabelecidas por Rostagno (2005), o mesmo padrão de ração, de manejo e fornecimento de água. Todas as salas eram compostas por piso plástico suspenso, sem aquecimento, controle de temperaturas por cortinas, bebedouros tipo chupeta e comedouros automáticos.

Tabela 1. Manejo de arração de ração na fase de creche

Fase	Tempo de consumo	Quantidade fornecida
Pré 1	5 dias	1 kg
Pré 2	6 dias	3 kg
Inicial 1	14 dias	6 kg
Inicial 2	12 a 15 dias	16 kg

Tabela 2. Programa de medicação utilizado (dose em g/ton)

Medicamento	Pré 1	Pré 2	Inicial 1	Inicial 2	Total (g/ton)
Amoxicilina	400	300	300	300	1300
Colistina	250	150	150	150	700
Aurion (Clortetraciclina, Sulfametazina com Trimetoprima)	0	0	600	600	1200

Os dados foram submetidos a análise de normalidade e posteriormente foram submetidos ao teste de T de Student ou Mann-Whitney quando dado não paramétrico, considerando $P < 0,05$ para diferença significativa e $P < 0,10$ efeito de tendência. Os

resultados foram analisados no programa estatístico SPSS v26.0 para Windows (IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago. USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais recebendo DFM na dieta apresentaram uma tendência a um maior ganho de peso nas fases Pré 1 e 2 quando comparados ao tratamento utilizando cinco fármacos (Tabela 3; $P < 0,10$). Podemos observar na fase Pré 1 um ganho de 46% e na fase Pré 2 um ganho de 7% em média para os animais que consumiram DFM na dieta em relação ao tratamento controle. Ao final do experimento o peso foi semelhante para os dois tratamentos.

De acordo com os parâmetros avaliados podemos observar um maior desempenho dos animais frente ao uso do aditivo quando comparado ao grupo Controle. Esses dados são positivos uma vez que o tratamento Controle possuía grandes quantidades de antibióticos e ácidos livres.

Tabela 3. Desempenho de leitões na fase de creche

Item, kg	5ATB		DFM		P-valor
	Média	EPM ¹	Média	EPM ¹	
Peso inicial	5,186	0,101	5,220	0,102	0,816
Peso final pré 1	5,318	0,101	5,478	0,103	0,270
Ganho de peso pré 1	0,132b	0,044	0,258 ^a	0,053	0,069
Ganho de peso diário pré 1	0,023b	0,007	0,043 ^a	0,009	0,078
Peso final pré 2	8,461b	0,173	8,883 ^a	0,174	0,087
Ganho de peso pré 2	3,142b	0,095	3,406 ^a	0,095	0,052
Ganho de peso diário pré 2	0,242b	0,007	0,262 ^a	0,007	0,054
Peso final inicial 1	13,504	0,264	13,981	0,260	0,200
Ganho de peso inicial 1	5,043	0,126	5,097	0,125	0,763
Ganho de peso diário inicial 1	0,388	0,010	0,392	0,010	0,798
Peso final inicial 2	19,163	0,348	19,355	0,371	0,706
Ganho de peso inicial 2	5,659	0,126	5,372	0,136	0,123
Ganho de peso diário inicial 2	0,568	0,013	0,540	0,014	0,127
Ganho de peso total	13,977	0,288	14,144	0,320	0,698
Ganho de peso diário total	0,333	0,007	0,337	0,008	0,694

ATB5 = Tratamento contendo cinco fármacos; a,b: Médias com diferentes letras minúsculas diferem entre si ($P < 0,10$; Teste de T de Student); ¹EPM = Erro Padrão da média.

A ação do DFM dirige-se basicamente em melhorar a saúde animal e consequentemente a performance, pois, atuam como biorreguladores do trato intestinal, tendo ação preventiva e curativa. O mecanismo de ação é complexo e pode variar conforme o microrganismo, fatores ambientais e condições físicas do animal hospedeiro. Através do uso de aditivos a base de DFM na ração, aspectos positivos na produtividade, na conversão alimentar e no ganho de peso têm sido constatados na literatura (Tournut, 1998).

As bactérias patogênicas produzem enterotoxinas que desencadeiam alterações no equilíbrio hídrico e eletrolítico do trato gastrointestinal dos animais, ocasionando quadros de diarreia e desidratação. Os aditivos a base de DFM possuem a capacidade de neutralizar e proteger o epitélio intestinal contra enterotoxinas, sendo este, um dos fatores mais importante para microbiota intestinal (Yirga, 2015). A redução de infecções desenvolvidas por agentes patogênicos através do uso de DMF possibilita uma microbiota favorável, com conseqüente redução de problemas sanitários e melhores índices zootécnicos (Simon, 2005).

O grande diferencial dos DFM são os microrganismos (cepas) a serem escolhidos, bem como sua pureza, fatores os quais podem atuar na potencialização do modo de ação. Nestes experimentos observamos um destaque positivo do produto a base de *Bacillus subtilis* cepa específica selecionada de suínos de alta eficiência, potencialmente devido a uma ação de proteção dos microrganismos benéficos permitindo maior saúde intestinal e fermentação eficiente dos alimentos (Bastos et al., 2020).

O microrganismo *Bacillus subtilis* é definido como um bacilo, gram positivo, não patogênico. Atua benéficamente na microbiota intestinal, tendo a capacidade de permanecer intacto durante todo o trânsito estomacal. A germinação dos esporos ocorre no intestino, sendo resistentes ao frio e ao calor, onde permanecem viáveis por longos períodos estocados sem refrigeração. Além disso, podem ser produzidos facilmente e por apresentarem a característica de esporos bacterianos resistentes, possuem estabilidade ofertando transporte e armazenagem até o epitélio intestinal (Cutting, 2011). Estes, são microrganismos transitórios que reduzem sua ação gradativamente entre as 24 horas após sua administração, sendo necessário assim, a ingestão contínua para alcançar os efeitos benéficos esperados (Sanders et al., 2003).

O modo de ação dos *Bacillus* pode ser por estímulo ao sistema imunológico, com ação antimicrobiana e exclusão competitiva. O *Bacillus subtilis* C-3102, é classificado como ingrediente ativo de “direct-fed microbial” produzindo ácido láctico e inibindo agentes patogênicos como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringes* e *Salmonella* (Hooge et al., 2004). Diversos fatores benéficos podem ocorrer no sistema imunológico do animal, pois esse microrganismo pode estimular a imunidade tanto em relação a resposta imune não-específica quanto específica, fatores decorrentes da ativação dos macrófagos, elevação nos níveis de citocinas, aumento na quantidade de imunoglobulinas e aumento na atividade de células destruidoras naturais (NK – “natural killer”) (Saad, 2006).

Ainda, os DFMs possuem o efeito de inibir a adesão, replicação e ação de enteropatógenos através de exclusão competitiva entre bactérias intestinais e patogênicas, produção de bacteriocinas que possuem elevado grau de ação contra bactérias gram-negativas, com ação inibitória frente a patógenos possibilitando a inibição direta do crescimento de microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal (Steczny & Kokosznski., Becker et al., 2020 a,b & Ni et al., 2019). Em consequência disso, o melhor desempenho tendo em vista o desafio enfrentado na granja onde o estudo foi realizado.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo a utilização de DFM como substituto ao uso de antibióticos, demonstrou ser eficaz podendo ser devido a ação de proteção dos microrganismos benéficos proporcionando melhor saúde intestinal e fermentação dos alimentos. Neste estudo o uso do aditivo permitiu um maior ganho de peso principalmente dos animais nas duas primeiras fases de creche em relação ao tratamento Controle contendo altas doses de antibióticos.

REFERÊNCIAS

- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I. E., Tzivara, A., Kyriakis, C. S., Govaris, A., & Kyriakis, S. C. (2004). Field evaluation of the effect of a probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 51(6), 306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00637.x>
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016). *Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation*. FAO.
- Bastos, T. S., de Lima, D. C., Souza, C. M. M., Maiorka, A., de Oliveira, S. G., Bittencourt, L. C., & Félix, A. P. (2020). *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-8.
- Becker, S. L., Li, Q., Burrough, E. R., Kenne, D., Sahin, O., Gould, S. A., & Patience, J. F. (2020). Effects of an F18 enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge on growth performance, immunological status, and gastrointestinal structure of weaned pigs and the potential protective effect of direct-fed microbial blends. *Journal of animal science*, 98(5), skaa113.
- Buntyn, J. O., Schmidt, T. B., Nisbet, D. J., & Callaway, T. R. (2016). The role of direct-fed microbials in conventional livestock production. *Annual review of animal biosciences*, 4, 335-355.
- Butolo, J. E. (2002). Qualidade de ingredientes na alimentação animal. *CBNA*, 430p.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Gavioli, D. F., de Oliveira, E. R., da Silva, A. A., Romero, N. C., Lozano, A. P., Silva, R. A. M., & da Silva, C. A. (2013). Efeito de promotores de crescimento para suínos sobre o desempenho zootécnico, a qualidade intestinal e a eficiência da biodigestão dos dejetos. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(2), 3983-3997.
- Gomes, B. C. K. (2016). Probiótico para suínos nas fases de maternidade e creche.
- Gonzales, E., de Carvalho Mello, H. H., & Café, M. B. (2012). Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. *Revista UFG*, 13(13).
- Hooge, D. M., Ishimaru, H., & Sims, M. D. (2004). Influence of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 spores on live performance of broiler chickens in four controlled pen trials. *Journal of Applied Poultry Research*, 13(2), 222-228.
- Junqueira, O. M., Barbosa, L. C. G. S., Pereira, A. A., Araújo, L. F., Garcia Neto, M., & Pinto, M. F. (2009). Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 2394-2400.
- Moraes, K. M. C. M. T. D. (2008). Probióticos para leitões lactentes e na fase de creche.
- Ni, J. Q., Shi, C., Liu, S., Richert, B. T., Vonderohe, C. E., & Radcliffe, J. S. (2019). Effects of antibiotic-free pig rearing on ammonia emissions from five pairs of swine rooms in a wean-to-finish experiment. *Environment international*, 131, 104931.

Nurmi, E., & Rantala, M. (1973). New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature*, 241(5386), 210-211.

Opalinski, M., Maiorka, A., Dahlke, F., Cunha, F., Vargas, F. S. C., & Cardozo, E. (2007). On the use of a probiotic (*Bacillus subtilis*-strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 9, 99-103.

Pollmann, D. S., Danielson, D. M., & Peo Jr, E. R. (1980). Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 51(3), 577-581.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. D., Lopes, D. C., & Euclides, R. F. (2005). Composição de alimentos e exigências nutricionais. *Tabelas brasileiras para aves e suínos*, 2.

Saad, S. M. I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 1-16.

Sanders, M. E., Morelli, L., & Tompkins, T. A. (2003). Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 101–110. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00017.x>

Sezen, A. G. (2013). Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics upon human and animal health. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(3), 248-258.

Simon, O., Vahjen, W., & Scharek, L. (2005). Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Advances in pork Production*, 16(2), 161.

Steczny, K., & Kokoszynski, D. (2020). Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition, and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm. *Animal biotechnology*, 1-8.

Tournut, J. R. (1998). Probiotics. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 179-199.

Umesaki, Y., Okada, Y., Imaoka, A., Setoyama, H., Matsumoto, S., Gordon, J. I., & Falk, P. G. (1997). Interactions between epithelial cells and bacteria, normal and pathogenic. *Science*, 276(5314), 964-966.

Yirga, H. (2015). The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal of Probiotics & Health*, 3, 1-10.

Ziemer, C. J., & Gibson, G. R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 473-479.