

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO

CAMILA CECCATO FERREIRA

ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALINHAS
POEDEIRAS SOB ESTRESSE CALÓRICO TRATADAS COM
MELHORADORES DE DESEMPENHO

CHAPECÓ

2023

CAMILA CECCATO FERREIRA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALINHAS
POEDEIRAS SOB ESTRESSE CALÓRICO TRATADAS COM
MELHORADORES DE DESEMPENHO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientadora: Prof. PhD Lenita de Cássia Moura Stefani.

Coorientadora: Prof. Dra. Denise Nunes Araujo.

CHAPECÓ

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Ferreira, Camila Ceccato

Análise metagenômica da microbiota intestinal de galinhas poedeiras sob estresse calórico tratadas com melhoradores de desempenho / Camila Ceccato Ferreira. -- 2023.

71 p.

Orientadora: Lenita de Cássia Moura Stefani

Coorientadora: Denise Nunes Araujo

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2023.

1. Avicultura. 2. Estresse calórico. 3. Modulação intestinal

4. Promotor de crescimento. 5. Sequenciamento genético. I. Stefani, Lenita de Cássia Moura . II. Araujo, Denise Nunes . III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CAMILA CECCATO FERREIRA

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALINHAS
POEDEIRAS SOB ESTRESSE CALÓRICO TRATADAS COM
MELHORADORES DE DESEMPENHO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Orientadora: Prof. PhD Lenita de Cássia Moura Stefani. Coorientadora: Prof. Dra. Denise Nunes Araujo.

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Documento assinado digitalmente
 **LENITA DE CÁSSIA MOURA STEFANI**
Data: 26/09/2023 11:42:13-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Lenita de Cássia Moura Stefani (doutora)
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Documento assinado digitalmente
 **MIKLOS MAXIMILIANO BAJAY**
Data: 26/09/2023 11:53:46-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Miklos Maximiliano Bajay (doutor)
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRO DE MELLO VARANI**
Data: 26/09/2023 13:41:43-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Alessandro de Mello Varani (doutor)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Chapecó, 28 de julho de 2023.

Aos meus pais e minha irmã que
estiveram ao meu lado com muita
paciência durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por abrir portas e permitir a realização desse projeto.

Agradeço fortemente aos meus pais e minha irmã, que passaram essa fase ao meu lado, me dando suporte e compreendendo as minhas ausências.

Aos meus amigos, por serem meu refúgio quando as coisas não iam muito bem, e por serem minha segunda família. Obrigada por deixarem essa caminhada mais leve.

Agradeço a minha orientadora Lenita, professores Marcel e Miklos por aceitarem conduzir o meu trabalho de pesquisa, e por todo o suporte.

A todos os meus professores do curso de Mestrado em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, pela excelência da qualidade técnica de cada um.

Agradeço aos colegas do projeto, mestrandos e estagiários, por toda a ajuda e companheirismo.

À empresa parceira, Tecphy®, por financiar o projeto.

E não menos importante... “Eu quero me agradecer por acreditar em mim mesmo. Quero me agradecer por todo esse trabalho duro. Quero me agradecer por não tirar folgas. Quero me agradecer por nunca desistir. Quero me agradecer por ser generoso e sempre dar mais do que recebo. Quero me agradecer por tentar sempre fazer mais o certo do que o errado. Quero me agradecer por ser eu mesmo, o tempo inteiro” – Snoop Dog.

“Entenda os seus medos, mas jamais
deixe que eles sufoquem os seus
sonhos.”

Alice no País das Maravilhas.

RESUMO

Com a crescente preocupação em relação à saúde pública, este estudo teve o objetivo de caracterizar a microbiota intestinal de galinhas poedeiras tratadas e não tratadas com melhoradores de desempenho, convencionais ou não, submetidas ao estresse calórico natural. O experimento contou com galinhas poedeiras (n=140, *Hy-Line Brown*, 15 semanas de vida), divididas aleatoriamente em 4 grupos com 7 repetições cada: 1. Controle (C); 2. Enramicina (E); 3. Tratamento alternativo 1 (500 g/ ton de ração, T1); 4. Tratamento alternativo 2 (250 g/ ton, T2). Foram realizadas quatro coletas de *swabs* de cloaca em diferentes tempos: T0/Controle: início da postura; T1: pico de postura; T2: início do terceiro ciclo; T3: final do terceiro ciclo, para análise metagenômica, realizada através da amplificação do gene 16S rRNA e posterior caracterização da microbiota intestinal, através do *software Mothur*. Foram registradas as temperaturas máximas e mínimas diariamente. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* estatístico R (versão R 3.6.0, para os índices de ACE, Shannon e nMDS) e *Statistica* (versão 10.0, para análise da variância). Foi observada diferença significativa de diversidade microbológica ($P \leq 0,0304$) no tempo T3, ficando superior aos demais tempos, e sem interferência quanto aos tratamentos. O gênero *Enterococcus spp.* foi predominante em todos os tempos e tratamentos, com 77,96% de prevalência, notável uma redução mais acentuada em T3 ($P \leq 0,00027$). O gênero *Corynebacterium spp.*, considerado patogênico, teve um aumento também em T3, de 136% em relação à T0 ($P \leq 0,00039$). Não houveram diferenças significativas entre tratamentos ($P \geq 0,05$). O aumento expressivo de *Corynebacterium spp.* possui forte relação com o estresse calórico imposto especificamente no tempo T3. *Enterococcus spp.* possui relação com saúde intestinal, e sua diminuição é esperada ao longo do ciclo produtivo. Em T3 houve maior diversidade microbológica, mesmo sob estresse calórico ($P \leq 0,0304$), com os tratamentos E, T1 e T2, mostrando resultados semelhantes entre si, além de T1 e T2, sugerir uma microbiota mais equilibrada. Conclui-se que os tratamentos T1 e T2 assemelham-se aos efeitos do antibiótico convencional no que se refere a microbiota intestinal.

Palavras-chave: Avicultura; Estresse calórico; Modulação intestinal; Promotor de crescimento; Sequenciamento genético.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the intestinal microbiota of laying hens treated and not treated with conventional and non-conventional performance enhancers, subjected to natural heat stress. The experiment included laying hens (n=140, Hy-Line Brown, 15-week-old), randomly divided into 4 groups with 7 repetitions each: 1. Control (C); 2. Enramycin (E); 3. Alternative treatment 1 (500 g/ton of feed, T1); 4. Alternative treatment 2 (250 g/ton, T2). Four swabs were collected from the cloaca at different times: T0/Control: beginning of posture; T1: peak laying; T2: beginning of the third cycle; T3: end of the third cycle, for metagenomic analysis, performed through the amplification of the 16S rRNA gene and subsequent characterization of the intestinal microbiota, through the Mothur software. Daily maximum and minimum temperatures were recorded. Statistical analyzes were performed using the statistical software R (R version 3.6.0, for ACE, Shannon and nMDS indices) and Statistica (version 10.0, for analysis of variance). A significant difference in microbiological diversity ($P \leq 0.0304$) was observed at time T3, being higher than the other times, and without interference with the treatments. The genus *Enterococcus* spp. was predominant at all times and treatments, with 77.96% prevalence and a more pronounced reduction in T3 ($P \leq 0.00027$). The genus *Corynebacterium* spp., considered pathogenic, also had an increase in T3, of 136% in relation to T0 ($P \leq 0.00039$). There were no significant differences between treatments ($P \geq 0.05$). The expressive increase of *Corynebacterium* spp. has a strong relationship with the caloric stress imposed specifically at time T3. *Enterococcus* spp. is related to intestinal health, and its decrease is expected throughout the production cycle. In T3, there was greater microbiological diversity, even under heat stress ($P \leq 0.0304$), with treatments E, T1 and T2, showing similar results among themselves, in addition to T1 and T2, suggesting a more balanced microbiota. It is concluded that treatments T1 and T2 are similar to the effects of conventional antibiotics with regard to the intestinal microbiota.

Keywords: Genetic sequencing; Growth promoter; Heat stress; Intestinal modulation; Poultry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coleta de swab de cloaca.....	39
Figura 2 - Gêneros de bactérias encontrados nos diferentes tratamentos e tempos de coletas.....	43
Figura 3 - Prevalência dos demais gêneros bacterianos de acordo com os tratamentos e tempos de coletas	44
Figura 4 - Índice de ACE estimando a riqueza de indivíduos encontrados de acordo com tempo e tratamento.....	45
Figura 5 - Índice de Shannon estimando a diversidade dos gêneros encontrados de acordo com tempo e tratamento.....	45
Figura 6 - Índice de beta diversidade através do resultado do escalonamento multidimensional não métrico.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração basal fornecida às galinhas poedeiras.	38
Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos utilizada na amplificação.....	40
Tabela 3 – Número de indivíduos dos gêneros <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Corynebacterium</i> spp. em função do tempo.....	47
Tabela 4 - Temperaturas médias registradas (máximas e mínimas) nos diferentes tempos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
°C	Graus Celsius
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
g	Grama
Ig	Imunoglobulina
IN	Instrução Normativa
Kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malonilaldeído
min	Minuto
MOS	Mananoligossacarídeos
NBR	Normas Técnicas Brasileiras
nM	Nanômetro
nMDS	Escalonamento multidimensional não métrico
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
OEO	Óleo essencial de orégano
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
seg	Segundo
TGI	Trato Gastrointestinal
Ton	Tonelada
uL	Microlitros
uM	Micrômetro
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivos gerais.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	PRODUÇÃO E CONSUMO DE OVOS	16
2.2.	O USO DOS ANTIMICROBIANOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO, RESISTÊNCIA BACTERIANA E A UTILIZAÇÃO DE MELHORADORES DE DESEMPENHO NÃO CONVENCIONAIS....	17
2.3	MICROBIOTA INTESTINAL E SUA MODULAÇÃO	23
2.4	ESTRESSE CALÓRICO NA PRODUÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS	27
2.5	ANÁLISE METAGENÔMICA.....	29
2.5.1	Alfa e beta diversidade.....	32
3	ARTICLE: METAGENOMIC ANALYSYS OF THE GUT MICROBIOTA OF LAYING HENS UNDER CALORIC STRESS TREATED WITH PERFORMANCE ENHANCERS.....	35
	ABSTRACT.....	36
3.1	INTRODUCTION	37
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	38
3.2.1	Facilities and experimental design	38
3.2.2	Metagenomic analysis	40
3.2.3	Statistical analysis	41
3.3	RESULTS AND DISCUSSION	42
3.3.1	Caloric Stress.....	50
3.5	CONCLUSION.....	51
	Acknowledgements.....	52
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO I – COMPROVANTE DO CEUA.....	69
	ANEXO II - GÊNEROS ENCONTRADOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de ovos para consumo humano, em 2021, atingiu 87,60 milhões de toneladas, com um aumento de 26,78% em relação a 2010. A China lidera a produção mundial de ovos, com o foco no consumo interno do país, produzindo cerca de 34,4 milhões de toneladas/ ano, e a União Europeia sendo líder mundial em exportação (cerca de 1.052 milhões de toneladas/ ano) (FAO, 2021). A projeção para os próximos anos mostra resultados animadores para o setor, com perspectiva de aumento da produção. Em um comparativo a nível nacional, a produção de ovos e o consumo *per capita* vêm se intensificando no Brasil nos últimos anos.

Embora se trate de uma atividade importante para a economia do país, o Brasil ainda apresenta oportunidades de crescimento. Uma alternativa para melhorar a produtividade e desempenho zootécnico das aves é a utilização de melhoradores de desempenho, antibióticos, como explica (RAMA *et al.*, 2023). Os autores observaram que estas substâncias, muito utilizados na dieta de granjas comerciais em dosagem subclínica, controlam agentes patogênicos ao trato digestivo, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal. Entretanto, como cita Maiorka *et al.* (2009), com a crescente preocupação com a saúde dos consumidores, por se tratarem de produtos que podem gerar possíveis resistências bacterianas, alguns países proibiram a sua utilização. Com a União Europeia sendo pioneira nesta ação, a utilização de antibióticos passou a ser feita somente com finalidades terapêuticas. A Instrução Normativa (IN) nº45 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 22 de novembro de 2016, válida em território nacional, proibiu a importação e a fabricação de sulfato de colistina, com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal (BRASIL, 2016), além de proibir também, os antimicrobianos: tilosina, lincomicina e tiamulina (BRASIL, 2018). Vários substitutos aos melhoradores de desempenho convencionais vêm sendo estudados, como os ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos, e mais recentemente, os óleos essenciais (OEs). Porém, os efeitos destes compostos na alimentação animal de galinhas poedeiras não estão totalmente esclarecidos na modulação da microbiota intestinal, deixando lacunas para estudo.

É vasta a literatura salientando a importância da microbiota intestinal equilibrada para a manutenção da saúde e nutrição do homem e dos animais. De acordo com Shauf *et al.*, (2015), uma análise minuciosa dessa microbiota, sabendo-se que ela está intimamente relacionada com o estado sanitário e imunológico das aves, é de grande importância para criar estratégias capazes de melhorar a saúde intestinal, e consequentemente, melhorar o desempenho produtivo dos animais. Entretanto, para se ter um maior conhecimento de como a microbiota intestinal das aves é caracterizada frente a diversos fatores, e com a utilização dos variados tipos de melhoradores de desempenho disponíveis, é necessário o emprego de técnicas complementares às tradicionais, de cultivo microbiológico, que apresentam muitas limitações. Os autores Wei *et al.* (2013) já apresentaram estudos em relação a microbiota intestinal de frangos de corte, com o método tradicional de cultivo microbiológico, o qual apresentou resultados imprecisos. Para corrigir essa limitação, e ter um melhor esclarecimento da diversidade microbiológica existente em determinada amostra, e detectar possíveis desequilíbrios da microbiota intestinal, é necessária a utilização de técnicas moleculares (MCMURDIE; HOLMES, 2013). A exemplo disso, uma alternativa relativamente recente é a análise metagenômica, através da técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

Avanços recentes em NGS, em particular aplicados aos genes codificadores do RNA ribossomal bacteriano (genes 16S rRNA), genes específicos de bactérias e, portanto, utilizados na detecção desses microrganismos, são cada vez mais utilizados na microbiologia, e têm expandido enormemente o conhecimento sobre a composição de um microbioma específico (ALMONÁCIDO *et al.*, 2017). Com a aplicação de NGS, é possível conhecer, de fato, quais os microrganismos intestinais predominantes em determinado plantel; compará-los em aves quando tratadas ou não, com os melhoradores de desempenho; caracterizá-los nas diferentes fases produtivas das aves, e em situações de estresse, e compreender os seus efeitos na saúde dos animais (ZENG *et al.*, 2023). Portanto, este trabalho visou caracterizar a microbiota intestinal de galinhas poedeiras em diferentes etapas do ciclo produtivo, averiguar os efeitos de melhoradores de desempenho convencionais (enramicina) e não convencionais (dois compostos naturais) na microbiota intestinal, e possíveis modificações nesta composição frente a situação de estresse calórico natural, através da técnica de NGS, tendo em vista o número escasso de estudos envolvendo modulação intestinal nestas espécies.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

1. Estudar os efeitos da utilização de melhoradores de desempenho convencionais e não convencionais na microbiota intestinal de galinhas poedeiras submetidas ao estresse calórico natural.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a microbiota intestinal de galinhas poedeiras tratadas com enramicina e com melhoradores de desempenho não convencionais (T1 e T2) em diferentes etapas do ciclo produtivo;

2. Comparar a microbiota intestinal de aves tratadas com enramicina e com melhoradores de desempenho não convencionais (T1 e T2);

3. Avaliar o comportamento da microbiota intestinal dos diferentes grupos frente ao estresse calórico natural.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE OVOS

A produção de ovos pode ser classificada de duas formas, de modo geral: produção de ovos férteis para incubação, destinada a produção de frangos de corte, e a produção de ovos comerciais não férteis, para consumo humano. O sistema de alojamento comercial mais comum para galinhas poedeiras no mundo é o sistema de gaiolas convencionais, dispostas em fileiras e colunas. Países da União Europeia, em função do bem-estar animal, proibiram as gaiolas de postura convencionais a partir de 2012 (MENCH *et al.*, 2011). Com isso, houve o desenvolvimento de vários sistemas alternativos de alojamento de galinhas poedeiras. Estes, incluem sistemas sem gaiolas, segundo Mench *et al.* (2011) conhecidos como *Cage Free*, ou sistemas com gaiolas modificadas, com enriquecimento ambiental, que incluem poleiros. Entretanto, fora os países da União Europeia que possuem essa proibição, é contabilizado que mais de 95% das galinhas poedeiras comerciais são alojadas em gaiolas convencionais, e este cenário ainda se faz presente no momento atual, incluindo países desenvolvidos e em desenvolvimento. Ainda, segundo o autor, o sistema de gaiola convencional foi desenvolvido na década de 1930, e começou a ser adotado em larga escala desde então, com a utilização de gaiolas maiores, permitindo que grupos de galinhas (normalmente cerca de 5 a 10 aves) fossem alojadas juntas, aumentando a eficiência econômica.

Em relação a produção mundial de ovos para consumo, a expectativa é que até 2030, a produção mundial atinja 95 milhões de toneladas e um aumento no consumo de ovos de 9%, comparado a 2021, considerando assim, que o produto faz parte de uma parcela significativa da dieta humana (VENKITANARAYANAN *et al.*, 2013). No âmbito nacional, embora a produção de ovos e o consumo *per capita* também tenha se intensificado no país nos últimos anos, o Brasil não atinge o mesmo patamar econômico quando comparado a sua posição mundial na produção de carne de frango. Embora o Brasil ainda precise consolidar sua produção de ovos, a atividade ainda é de extrema importância no país para a economia interna, por se tratar de um alimento saudável, rico em proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais (NOLAN *et al.*, 2005), e por ser um produto de origem animal de baixo custo e de fácil acesso às classes sociais distintas. De acordo com o relatório da Associação Brasileira de

Proteína Animal (ABPA), de 2021, 96% dos lares brasileiros consomem ovos, e metade da população brasileira ingere o produto diariamente.

2.2 O USO DOS ANTIMICROBIANOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO, RESISTÊNCIA BACTERIANA E A UTILIZAÇÃO DE MELHORADORES DE DESEMPENHO NÃO CONVENCIONAIS

A segurança de produtos avícolas, bem como a saúde das aves, é de imensa importância na saúde pública e na economia do setor. Neste contexto, em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a FAO lançaram uma iniciativa chamada “Saúde Única” (*One Health*) muito discutido atualmente. O termo abrange ligações entre saúde humana, animal e ambiental, a fim de demonstrar suas inseparabilidades e importância de um ecossistema harmônico, envolvendo múltiplos processos e suas interações, a nível global (RUEGG *et al.*, 2018).

Entretanto, para ofertar um alimento de qualidade e seguro à população, algumas etapas do processo produtivo animal utilizam protocolos que podem trazer riscos à população. Como uma alternativa para ter animais de fato produtivos, com bons índices zootécnicos e maximizar ganhos, o uso de promotores de crescimento, em dosagens subclínicas na nutrição animal, foi amplamente utilizado, embora atualmente com algumas restrições para a utilização. Segundo Rama *et al.* (2023), os antibióticos utilizados na dieta de granjas comerciais em dosagem subclínica, como melhoradores de desempenho, têm como finalidade controlar microrganismos patogênicos ao trato digestivo, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal. Entretanto, de acordo com Carvalho e Carvalho (2002), bactérias, de modo geral apresentam grande capacidade de adaptação e, em função dessa característica, a ocorrência de resistência bacteriana a diferentes antimicrobianos se torna uma possibilidade. A exemplo disso, como cita Voss-Rech *et al.* (2019), nos últimos anos a bactéria *Salmonella Heidelberg* está entre as cepas mais encontradas na produção animal e nos produtos da sua cadeia. Gieraltowski *et al.*, (2016) avaliaram a resistência de 69 amostras de *S. Heidelberg* e verificaram que 67% das cepas eram resistentes a antibióticos e, que destas, 35% eram multirresistentes. Taylor *et al.* (2015) isolaram nove amostras da mesma bactéria e descobriram que duas destas eram multirresistentes à cefalosporina e ceftriaxona, antibióticos de terceira geração. Com a segurança alimentar questionada frente ao uso contínuo de antibióticos e em

dosagens subclínicas, houve um consenso dentre diversos países que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal é uma das causas do aumento da emergência de microrganismos resistentes. Os efeitos negativos da utilização de antibióticos, como promotores de crescimento, além de suas restrições de uso atualmente, têm levado pesquisadores e empresários a uma busca de aditivos alimentares alternativos a estes (LORENÇON *et al.*, 2007), com a finalidade de reduzir as perdas na produtividade (ARAÚJO *et al.*, 2007), na ausência dos antibióticos na dieta. Como consequência, opções de substitutos aos promotores de crescimento, como melhoradores de desempenho, se fazem necessárias.

A utilização de extratos derivados de plantas, os fitoterápicos, tem despertado interesse na produção animal, tendo em vista seus benefícios em substituição aos antibióticos, relatados em estudos recentes (MOLOSSE *et al.*, 2022). Historicamente, as plantas têm servido como fontes de novos medicamentos, contribuindo para a saúde e o bem-estar humano. Segundo descobertas recentes, fitoterápicos podem atuar de forma benéfica sobre os microrganismos patogênicos encontrados no intestino dos animais (MITSCH *et al.*, 2004). De acordo com Peric *et al.* (2009), fitoterápicos se trata de substâncias derivadas de plantas medicinais ou de especiarias, que têm efeito positivo sobre a produção e a saúde dos animais, onde muitas delas possuem grande popularidade na gastronomia, através de condimentos, como o alho, canela, orégano e tomilho, por exemplo. Ainda, segundo os autores, os fitoterápicos podem ser extraídos de várias partes da planta, e podem se apresentarem de formas variadas, como através de chás, compostos ativos, extratos, óleos resinas e óleos essenciais.

No que diz respeito aos óleos essenciais (OE), estes são substâncias bioativas fitoterápicas, extraídas de flores, folhas, sementes, frutas, caules e raízes (GADDE *et al.*, 2017). São produtos voláteis obtidos pela técnica de arraste a vapor ou prensagem, de característica lipofílica e de composição variada, contendo aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, hidrocarbonetos, todos em concentrações diferentes, dos quais um ou mais compostos se destacam por serem farmacologicamente ativos (BONA *et al.*, 2012). OE apresentam potente ação antimicrobiana, além de efeitos antioxidantes que trazem benefícios gerais para a saúde animal (ARMANINI *et al.*, 2021; OLADEJI *et al.*, 2019; SALAH *et al.*, 2019). As propriedades antimicrobianas de vários OEs foram demonstradas anteriormente (BURT, 2004; HOLLEY *et al.*, 2005), e uma variedade de componentes ativos foram identificados (VENKITANARAYANAN *et*

al., 2013). No entanto, os efeitos dessas inclusões na alimentação animal não estão totalmente elucidados no que tange a modulação da microbiota intestinal, principalmente em galinhas poedeiras, e existem poucas pesquisas com suas aplicações usando biotecnologias.

Alali (2013) avaliou o efeito de produtos alternativos no desempenho de aves de corte. Um dos tratamentos era composto de 4% de mistura de ácido orgânico; 0,025% de mistura de óleos essenciais (composto majoritariamente por carvacrol, timol e eucaliptol) e 0,44% de ácido láctico. O autor constatou que os animais que receberam este tratamento apresentaram maior ganho de peso e menor mortalidade, ao comparar aos outros produtos. Ainda, foi observado tanto no grupo controle, com ácido láctico, quanto no controle com os OEs, uma diminuição considerável na liberação de *S. Heidelberg* nas fezes. Estes resultados mostram que a utilização de produtos não farmacêuticos na alimentação deve ser considerada quando se trata de saúde animal, eliminação de patógenos e microbiota equilibrada, quando o foco é substituição aos antibióticos, necessitando de estudos mais detalhados para as diferentes cadeias de produção, e entre os diferentes compostos fitoterápicos conhecidos.

Os ácidos orgânicos, amplamente utilizados na nutrição animal, permitem a redução do pH na alimentação e no trato digestivo dos animais, auxiliando na defesa contra patógenos sensíveis ao pH, melhorando a digestibilidade dos nutrientes e o desempenho das aves (DITTOE *et al.*, 2018; SCICUTELLA *et al.*, 2021). O baixo pH gástrico acelera a conversão de pepsinogênio em pepsina, o que melhora a absorção de aminoácidos, proteínas e minerais (LIEM *et al.*, 2008). Em relação à poedeiras, embora sejam escassos os estudos em relação a modulação intestinal nessa espécie, existem estudos avaliando os efeitos dos ácidos orgânicos na produtividade de galinhas poedeiras. Foi constatado que há um declínio na qualidade da casca do ovo à medida que a ave envelhece, o que é atribuído ao aumento do peso do ovo sem aumento da quantidade de carbonato de cálcio depositado na casca (WISTEDT *et al.*, 2014). A incidência de ovos trincados pode ultrapassar 20% no final do período de postura, o que causa grandes perdas econômicas (ZHANG *et al.*, 2021). Ao diminuir o pH do trato digestivo, os ácidos orgânicos facilitam a solubilidade e digestibilidade de fósforo e cálcio, o que contribui para maior deposição de carbonato de cálcio na casca do ovo e melhor qualidade da casca de galinhas poedeiras (CAO *et al.*, 2022).

Se tratando de galinhas poedeiras, várias combinações de OEs de orégano (OEO), tomilho, alecrim e cúrcuma têm sido estudados como suplementos em dietas dessas aves, com o objetivo de melhorar o desempenho e a estabilidade oxidativa de seus ovos (MIGLIORINI *et al.*, 2019). Dentre esses compostos, o orégano (*Origanum vulgare*) é considerado uma importante fonte de moléculas antimicrobianas e antioxidantes, com propriedades biológicas desejáveis que melhoram a saúde de galinhas poedeiras. O OEO também já foi considerado eficaz contra infecções bacterianas e fúngicas do trato gastrointestinal de frangos de cortes (CHUN *et al.*, 2005; BLUMENTHAL *et al.*, 2020). Resultados satisfatórios envolvendo sua utilização na ração também foram encontrados por Peng *et al.*, (2020), que obtiveram melhor conversão alimentar, menor deposição de gordura abdominal, e maior ganho de peso médio diário. Os autores Zhang *et al.* (2021), ao testarem antibióticos associados ao OEO, também em frangos de corte, observaram que as aves suplementadas apresentaram população reduzida de *Escherichia coli* no trato gastrointestinal, e população aumentada de *Lactobacillus spp*, dando destaque sobre a importância que essa última população citada traz contra bactérias patogênicas. Tekce e Gül (2017) relataram que OEO também possui efeito protetor contra o estresse térmico em frangos de corte. Dados como esses citados, ainda são inconclusivos (MIGLIORINI *et al.*, 2019) e mais estudos envolvendo galinhas poedeiras ainda precisam ser aprofundados.

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é um dos medicamentos fitoterápicos mais antigos (4.000 anos atrás) (DOSOKY *et al.*, 2021), e atualmente, vários estudos trazem resultados promissores sobre sua utilização na saúde animal. O OE desta espécie, rico em transcinamaldeído, apresenta ação antimicrobiana contra patógenos que causam intoxicação alimentar, além de bactérias deteriorantes e fungos (ABD EL-HACK *et al.*, 2020). Além da ação antimicrobiana, o óleo e extratos de canela possuem atividades antioxidantes, atribuída aos compostos fenólicos e polifenólicos (TOMAINO *et al.*, 2005). Lee *et al.*, (2004) relata que a adição de canela na dieta de frangos de corte melhora o desempenho de crescimento, o ganho de peso e a conversão alimentar. Ainda, Dosoky *et al.*, (2021) demonstraram que a suplementação de canela na dieta de codornas japonesas aumentou a taxa de postura, número de ovos, peso dos ovos, e diminuiu a conversão alimentar dessas aves embora ainda seja necessário maiores informações a respeito dos efeitos do OE de canela em galinhas poedeiras.

Outro participante do grupo dos melhoradores de desempenho não convencionais são os probióticos, microrganismos vivos que podem melhorar o estado geral de saúde, desempenho de crescimento e o sistema imunológico do hospedeiro, além de fornecer energia e conservar a integridade estrutural e funcional do intestino (KHAJEH BAMI *et al.*, 2020). Os diferentes gêneros de bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*, têm sido comumente usados como probióticos na forma de cepa única ou multicepas em aves (YAQOOB *et al.*, 2022). A via de administração oral é a forma mais comum de administrar os probióticos (HAN *et al.*, 2021). Estes influenciam diretamente outras bactérias, incluindo patógenos, pela produção de metabólitos e compostos antimicrobianos, ocupação de nichos ecológicos no intestino para excluir competitivamente a colonização de outras bactérias e pela redução do pH luminal, modulando o intestino desta forma (KHAN *et al.*; 2020). Em galinhas poedeiras, a suplementação dietética com probióticos, como *Clostridium butyricum*, ou uma combinação de *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces boulardii* pode melhorar o desempenho de postura, a conversão alimentar, a qualidade do ovo e a força da casca, e a saúde intestinal de galinhas poedeiras (XIANG *et al.*, 2019). Os autores Khan *et al.* (2020), mostraram em seus estudos que a utilização dos diversos tipos de probióticos é capaz de controlar a proliferação dos patógenos *Salmonella* e *Campylobacter*. Gadde *et al.* (2017) relatam em seu estudo que através da utilização dos probióticos na ração, também obteve o resultado de minimizar a incidência de patógenos na microbiota intestinal, além de melhorar o crescimento e desempenho desta espécie, quando utilizado em aves saudáveis. Os efeitos terapêuticos e imunomoduladores de probióticos com *Lactobacillus* spp. e *Bacillus* spp. têm sido repetidamente avaliados em vários estudos para controlar anormalidades gastrointestinais, respiratórias e reprodutivas em frangos de corte (CARVALHO; CARVALHO, 2002; AHMAT *et al.*, 2021), quando administrados na ração, com resultados ainda não conclusivos.

Lehtoranta *et al.* (2020) observou que os probióticos podem controlar, inclusive, as doenças virais, capturando o vírus, inibindo seu crescimento e estimulando as respostas imunes do hospedeiro. O autor explica que além da via oral, vários estudos com animais, mostram os probióticos sendo usados por meio de *sprays* nasais de forma profilática contra vírus respiratórios. Ainda, Luan *et al.* (2019), mostraram que a aplicação de *spray* de *Bacillus amyloliquefaciens* melhora o estado de saúde do trato respiratório dos frangos de corte.

Ainda, os prebióticos, também muito conhecidos na nutrição animal, são aditivos alimentares naturais, considerados ingredientes dietéticos não digeríveis, como os carboidratos não absorvíveis. Estes servem de substrato para bactérias benéficas, como os *Lactobacillus spp.* e bifidobactérias, auxiliando na manutenção desta microbiota, que podem modificar os processos biológicos no trato gastrointestinal (TGI) dos animais, a fim de melhorar o desempenho e sua saúde (YAQOOB *et al.*, 2021). Estes aditivos oferecem muitas vantagens econômicas, diminuindo as taxas de mortalidade, aumentando as taxas de crescimento e melhorando a eficiência alimentar das aves (ELGEDDAWY *et al.* 2020). Como exemplo de carboidratos não absorvíveis, a inulina, o transgalactoligossacarídeo e, mais recentemente, o amido resistente, mananoligossacarídeos (MOS) e lactulose, foram considerados prebióticos (BOLER; FAHEY, 2012; HUTKINS *et al.*, 2016). A maioria dos alimentos contém pelo menos uma pequena quantidade de material prebiótico. Em galinhas poedeiras, estes compostos têm uma influência positiva na taxa de postura. De acordo com Chun *et al.* (2005), a suplementação de prebiótico do tipo oligofrutose (1,0%) e inulina (1,0%) na dieta de poedeiras, aumentou a produção de ovos em 13,35 e 10,73%, respectivamente, e aumentou o peso do ovo em 12,50% e 10,96%, respectivamente, em relação ao controle (BONA *et al.*, 2012). Os autores Khan *et al.* (2020) também apontam em seus estudos os efeitos do uso de prebióticos no controle de *Salmonella* em aves, sendo, portanto, uma estratégia de manipulação positiva da microbiota intestinal. Embora os pesquisadores aceitem as reivindicações sobre os benefícios dos prebióticos na modulação intestinal, seus efeitos e mecanismos moleculares não são totalmente esclarecidos, principalmente em galinhas poedeiras.

Outra opção de aditivo alimentar utilizado na alimentação animal, é a parede celular de levedura, contendo MOS capazes de se ligarem à patógenos com fímbrias tipo 1 e impedirem a adesão à parede intestinal, evitando a proliferação destes microrganismos (SUGANUMA *et al.*, 2021). Estudos anteriores mostraram níveis reduzidos de *Salmonella* quando a parede de levedura é adicionada à ração de galinhas poedeiras (HOFACRE *et al.*, 2018), frangos de corte (BONATO *et al.*, 2020) e perus (RAHIMI *et al.*, 2019). No entanto, há dados limitados disponíveis sobre o benefício da combinação destes dois compostos para galinhas poedeiras.

Entre os compostos testados neste experimento, o composto denominado T1, formado por extratos vegetais (7% de timol, carvacrol e cinamaldeído), também OE

de canela e orégano, parede de levedura, *pool* de bactérias benéficas (probióticos) e minerais orgânicos, tem o objetivo de atuar na formação, modulação e recuperação da microbiota intestinal, indicado para desafios entéricos e virais. Bosetti e colaboradores (2020) testaram esse composto (T1) em dietas de frangos de corte e obtiveram bom desempenho, integridade intestinal e qualidade da carne. Em outro estudo, a suplementação com 150 g/ ton desse mesmo composto substituiu os promotores convencionais de crescimento sem comprometer o desempenho ou a mucosa intestinal (GALLI *et al.*, 2020). O carvacrol e timol são os principais ingredientes do OEO, obtido de *Origanum glandulosum* (BENDAHOUE *et al.*, 2007).

O segundo composto testado, denominado T2, é formado por um *blend* de fitoativos (orégano, canela e cúrcuma) e ácidos orgânicos, indicado para desafios entéricos e como melhorador de desempenho. Estudos recentes encontraram um desempenho superior em frangos de corte que receberam suplementação de 250 g/ ton com esse composto (ARMANINI *et al.*, 2021).

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E SUA MODULAÇÃO

O trato gastrointestinal tem como principal função a absorção de nutrientes necessários para a manutenção, crescimento e reprodução do indivíduo (BARRETO *et al.*, 2008; SANTOS; FERKET, 2007), sendo a absorção totalmente dependente de mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal, bem como, dependente da integridade de suas estruturas celulares. A microbiota intestinal é um ecossistema único, conhecido como o "segundo genoma" dos seres vivos (AGIRMAN *et al.*, 2021). O número e a diversidade dessa microbiota variam de acordo com as particularidades de cada indivíduo, como raça, idade e sexo, espécie, bem como diferenças de clima, composição da alimentação, estilo de manejo e o estresse imposto as aves, e são pontos-chaves que afetam a saúde intestinal. Em humanos, estudos revelaram que a microbiota intestinal está intimamente relacionada aos fatores de risco para a ocorrência de AVC, sua progressão, bem como o tratamento e prognóstico da doença (SINGH *et al.*, 2016), onde a nutrição combinada com probióticos, pode efetivamente melhorar o estado de saúde de pacientes, regular a microbiota intestinal e a função da barreira da mucosa intestinal, melhorar a função imunológica e reduzir a incidência de complicações da doença (CHEN *et al.*, 2022).

A microbiota intestinal também está relacionada à modulação e o desenvolvimento do sistema imunológico precoce, de modo geral para todas as

espécies, e a desregulação do eixo microbiota-intestino-cérebro pode causar doenças metabólicas (CRYAN *et al.*, 2019; MORKL *et al.*, 2020). Esses efeitos moduladores são mediados por complexas interações microbianas e metabólitos produzidos pelos membros da comunidade microbiana, ou derivados da transformação de moléculas do hospedeiro, ou dieta (AGUS *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2021).

Atualmente, os pesquisadores descobriram um novo conceito deste eixo para explicar a complexa relação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, sugerindo que esta microbiota regula o eixo principalmente pela mediação de módulos neurobiológicos, vias reguladoras de módulos imunológicos e neurotransmissores mediados por metabólitos microbianos e sinais endócrinos (ZENG *et al.*, 2023; MARGOLIS *et al.*, 2021; QUIGLEY, 2017). Curiosamente, a microbiota intestinal está amplamente envolvida na síntese e liberação de vários hormônios, metabólitos ativos, neurotransmissores e outros compostos ativos, que, por sua vez, influenciam a função cerebral e o comportamento do hospedeiro (WANG; WANG, 2016). Por exemplo, Yang *et al.* (2022) descobriram que os neurônios da dor no intestino do camundongo - neurônios nociceptores - regulam a presença de muco protetor em condições normais e estimulam as células intestinais a liberar mais muco em condições inflamatórias (ZENG *et al.*, 2023). Zhang *et al.* (2022) reportaram que o receptor TRPV1 + (receptor que desempenha papel chave na detecção de vários estímulos dolorosos) desempenha também uma nova função reguladora imunológica, nomeado de *neuron-microbiota crosstalk*, apresentando um papel fundamental na imunidade intestinal e na homeostase microbiana intestinal. Portanto, é notável que a microbiota intestinal apresenta estreita relação com a saúde do hospedeiro.

Com relação a produção de aves, pesquisas mostram que a utilização de aditivos alternativos na alimentação de aves (JONES; RICKE, 2003; GODOI *et al.*, 2008), como fitoterápicos, prebióticos, probióticos, simbióticos e ácidos orgânicos, mantém a homeostase da microbiota intestinal, seja eliminando potenciais patógenos do local ou acrescentando microrganismos benéficos. Consequentemente, com uma microbiota intestinal saudável e equilibrada, há o aumento de taxas de crescimento e sobrevivência, melhora na saúde do trato gastrointestinal e eficiência alimentar e ainda, aumento da disponibilidade dos nutrientes da dieta para as aves (STEFANELLO *et al.*, 2020). A manutenção da saúde e integridade da mucosa intestinal, bem como da microbiota, é um dos fatores que aperfeiçoam a expressão

genética das aves e, interfere de forma direta nos índices zootécnicos de desempenho (DAI *et al.*, 2020).

Como explica Mikulski *et al.*, (2012), em contrapartida aos promotores de crescimento, numerosos estudos tentaram várias abordagens nutricionais para aumentar a eficácia de produção, visando melhorias na qualidade dos ovos e na segurança alimentar, e encontraram aminoácidos (KHAJEH BAMI *et al.*, 2020), vitaminas e minerais (ALAGAWANY *et al.*, 2020), compostos bioativos naturais de plantas (FENG *et al.*, 2021), prebióticos e probióticos (JAMALKANDI *et al.*, 2021) e enzimas (LEI *et al.*, 2022), como uma importante estratégia com efeitos positivos na modulação intestinal, e consequentemente, na produtividade. Notavelmente, a melhoria da qualidade do ovo foi geralmente acompanhada pela alteração da microbiota intestinal nesses estudos, sugerindo interações críticas entre a microbiota intestinal e as respostas nutricionais, bem como a saúde fisiológica das poedeiras (DAI *et al.*, 2022).

Os sistemas intensivos de criação de frangos de corte, bem como os sistemas de criação de galinhas poedeiras, impõem aos animais permanentes desafios. De acordo com os autores, Rzeznitzek *et al.* (2022) e Hafez e Attia (2020), um desafio enfrentado pela indústria é otimizar a eficiência da produção, preservando os padrões de saúde e bem-estar animal, onde estes dois, estão diretamente ligados à saúde intestinal (SCUPHAM, 2007). Estes desafios causam alterações no pH, inibindo a proliferação de alguns microrganismos e proliferando outros. Com isso, há um desequilíbrio da microbiota intestinal, também chamado de disbiose, provocando alterações dos índices morfométricos, com interferência na digestão e absorção de nutrientes (LOPES, 2008). Causas infecciosas, pela ação destes agentes, e não infecciosas, ocasionada por uma alteração de pH, por mudança na dieta, por exemplo, podem levar a danos na mucosa, com atrofia das vilosidades, seguido de hiperplasia das criptas, onde a renovação dos enterócitos é aumentada (RZEZNITZECK *et al.*, 2022). Esse atrofiamento das vilosidades pode influenciar negativamente no processo de absorção de nutrientes no intestino, prejudicando a qualidade dos ovos, e a produtividade de modo geral.

De acordo com DAI *et al.* (2020), embora existam muitos gêneros bacterianos comuns entre frangos de corte e poedeiras, também existem diferenças na abundância e riqueza desses gêneros devido a diferenças nas necessidades nutricionais e energéticas de cada linhagem. Os autores citam que frangos de corte e

poedeiras têm grandes diferenças em sua fisiologia, manejo, práticas de alimentação e tempo de vida, e é difícil comparar a microbiota intestinal. Além disso, as alterações endócrinas no início da postura podem influenciar potencialmente a microbiota intestinal em galinhas poedeiras. Vários estudos indicam que a idade das aves é a principal força motriz de mudanças na microbiota intestinal (DAI *et al.*, 2022; BALLOU *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2019) que requer a consideração da composição e sucessão da linha de base microbiana durante longos períodos de vida para moldá-la de forma eficaz. Atualmente, a composição e a função da microbiota intestinal de aves foram bem caracterizadas e esclarecidas em frangos de corte (HUNG *et al.*, 2018; SHANG *et al.*, 2018). No entanto, poedeiras têm expectativa de vida mais longa, diferentes genótipos, exigências dietéticas e condições de criação do que frangos de corte (KERS *et al.*, 2018), o que modifica a microbiota em relação a frangos de corte. Estudos anteriores sobre a microbiota de poedeiras foram limitados a uma idade específica, e seus efeitos regulatórios na qualidade e segurança dos ovos ainda não estão claros.

Anteriormente, acreditava-se que os embriões de galinhas eram estéreis e que a microbiota inicial se originava em um ambiente pós-nascimento (DAI *et al.*, 2022). No entanto, estudos relatam a presença de diversos microrganismos em embriões de galinhas (DAI *et al.*, 2020), indicando que a microbiota materna penetra a casca e afeta a colonização microbiana intestinal. Além disso, outro estudo feito por Shang *et al.*, (2018) também afirma que, se tratando de uma ave adulta, a população de microrganismos se diferencia, de acordo com o segmento do sistema gastrointestinal, e estes, sofrem alterações na sua composição ao longo de toda a vida do animal. Isso porque cada um destes segmentos forma microambientes distintos entre si, ou seja, apresentam mudanças, principalmente de pH, selecionando os microrganismos. Um estudo conduzido por Khan *et al.*, (2020), também cita afirmações nessa mesma linha, onde a comunidade bacteriana encontrada em aves, se diferenciam entre si, de acordo com o segmento anatômico em análise, pelos diferentes tipos de espécies, diferentes sistemas de produção, idade, genótipo e dieta fornecida. Galinhas poedeiras e frangos de corte, por exemplo, apresentam genótipos distintos, além de expectativa de vida, sistema de produção e necessidade nutricional também distintos. Então, a composição da microbiota intestinal nessas duas linhagens é diferente (PANDIT *et al.*, 2018). A formação da microbiota intestinal das aves, portanto, inicia ainda na fase embrionária (PEDROSO *et al.*, 2006; FURLAN, 2010). Seu

desenvolvimento segue rapidamente após o 1º dia de nascimento e, por volta do dia 7, a maioria dos organismos encontrados na microbiota madura já estão presentes, embora os números relativos tendam a flutuar por várias semanas antes de se estabilizar (BALLOU *et al.*, 2016).

Se tratando especificamente de galinhas poedeiras, os segmentos proximais do intestino são caracterizados por pH baixo, o que seleciona fortemente bactérias tolerantes a ácidos e limita o crescimento da maioria dos patógenos (THOMPSON; HINTON, 1997). A cultura é dominada por *Blautia*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, enquanto no ceco, além das anteriores, outras bactérias como *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Ruminococcus* também são abundantes (JANCZYK *et al.*, 2009; SAXENA *et al.*, 2016). No ceco de galinhas poedeiras maduras, as comunidades microbianas representativas no nível do filo, em ordem de sua abundância, são: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Deferribacteres*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Synergistetes* e *Lentisphaerae* (DONG *et al.*, 2017). Avaliando o efeito idade na mesma linhagem, após 2 semanas pós-eclosão, *Ruminococcus* e *Oscillospira* aumentam substancialmente enquanto a representação de *Enterococcus* é reduzida. Comparado com a oitava semana de vida, na semana 30, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* tornam-se mais abundantes no intestino. Isso mostra que as bactérias gram-negativas dominam o intestino em uma idade precoce, enquanto as *Firmicutes* se tornam mais proeminentes na idade posterior do ciclo de postura das galinhas (STANLEY *et al.*, 2014). Ainda, a abundância de *Bacteroidetes* é menor em aves de gaiola, enquanto a abundância de *Firmicutes* é maior em aves caipiras (XU *et al.*, 2016). Embora se saiba que a microbiota intestinal de galinhas poedeiras é mais complexa e mais rica do que em frangos de corte (OCEJO, 2019), a literatura disponível sobre composição de sua microbiota intestinal é limitada, necessitando de mais estudos aprofundados neste assunto.

2.4 ESTRESSE CALÓRICO NA PRODUÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS

Na produção avícola, uma ampla gama de fatores, incluindo manejo, nutrição, ambiente e condições sanitárias, podem causar estresse nas aves (SURAI *et al.*, 2019). O calor é um dos principais estressores ambientais que afetam negativamente a produção avícola, interferindo na taxa de crescimento, no desempenho da produção, na resposta imune, na função intestinal, na microbiota intestinal, na biodisponibilidade

de energia nas células e na obtenção da homeostase do corpo, resultando em enormes perdas econômicas para a indústria avícola (SAEED *et al.*, 2019; UYANGA *et al.*, 2021). Nesta condição, as aves apresentam aumento da temperatura corporal, da frequência respiratória e da produção de calor metabólico, diminuindo o consumo de ração, que conseqüentemente, prejudica o desempenho animal, causa disfunção imunológica, prejudica a digestibilidade e o metabolismo dos nutrientes, altera a integridade intestinal e a composição da microbiota, e aumenta a mortalidade (BRUGALETTA *et al.*, 2022; UYANGA *et al.*, 2022).

Durante o estresse térmico, principalmente no período de verão em regiões tropicais e subtropicais, há uma necessidade iminente de desenvolver estratégias úteis que ajudem a superar os efeitos do estresse em animais de produção (QIN *et al.*, 2023). Além das melhorias ambientais, a nível de instalações, durante a vida produtiva das aves, a manipulação da dieta é um mecanismo vital que pode contribuir para aliviar os impactos negativos do estresse térmico (ABDEL-MONEIM *et al.*, 2021). A manipulação dietética envolve a inclusão de aditivos funcionais com propriedades benéficas às dietas de aves (OLGUN *et al.*, 2021). Esta é uma prática aceitável, que envolve a inclusão de vitaminas, minerais, aminoácidos, fitogênicos, promotores de crescimento, antioxidantes, nutracêuticos, probióticos, entre outros (ABD *et al.*, 2020; ALAGAWANY *et al.*, 2020). O principal objetivo desta manipulação dietética é o efeito protetor que esses aditivos podem apresentar nos animais, a fim de melhorar a capacidade antioxidante e a função imunológica das aves, e reduzir potenciais bactérias patogênicas na microbiota intestinal.

As galinhas poedeiras e frangos de corte são particularmente sensíveis ao calor devido à intensa seleção genética, levando a uma alta produção de calor metabólico e uma reduzida capacidade de termorregulação (FU *et al.*, 2023). As questões de saúde e bem-estar das aves pioraram com as recentes mudanças climáticas, que aumentaram as ondas de calor. No verão de 2022, o período em que este experimento ocorreu, foi marcado com grandes ondas de calor que varreram o mundo, e quebrou um recorde diário (ROSENTHAL; PATEL, 2022). Além disso, a capacidade de termorregulação corporal das galinhas é limitada pela presença das penas e pela ausência de glândulas sudoríparas (FU *et al.*, 2023).

Brito *et al.* (2023) observaram que à medida que as galinhas poedeiras envelhecem, diminuem gradualmente a produtividade e a qualidade da casca dos ovos também diminui, e que quando a temperatura ultrapassa 30°C, surgem sinais de

estresse térmico. Desafios da produção comercial, como o estresse calórico, contribuem ainda mais para o comprometimento do desempenho animal e da qualidade de seus produtos. Estudos demonstraram que a temperatura ambiente ideal para galinhas poedeiras é de aproximadamente 20 a 25°C (TUMOVA; GOUS, 2012). Os autores Liu *et al.*, (2020) avaliaram o efeito da curcumina suplementada na dieta de galinhas poedeiras sob estresse térmico, e notaram um aumento da espessura da casca dos ovos, a resistência da casca e o peso da gema do ovo. Além disso, observaram que a curcumina melhorou significativamente a atividade antioxidante das aves, aumentando os níveis de atividade de enzimas antioxidantes, e diminuiu o nível de malonilaldeído (MDA), responsável por danos na membrana celular, além de aumentar os níveis de imunoglobulinas no soro das galinhas, quando comparado ao seu grupo controle. O estudo sugere que o uso de fitoterápicos, como a curcumina, podem ser uma boa opção na redução dos danos causados aos animais sob estresse térmico.

Embora já existam estudos mostrando os prejuízos causados pelo estresse térmico na produtividade de galinhas poedeiras, esse impacto negativo precisa ser melhor esclarecido a nível de microbiota intestinal, para possibilitar estratégias de modulação e prevenção de perdas. Outro ponto que ainda não se tem conhecimento o suficiente é se a utilização de melhoradores de desempenho não convencionais será capaz de proteger a saúde intestinal frente ao calor.

2.5 ANÁLISE METAGENÔMICA

A análise metagenômica é uma abordagem baseada na avaliação genômica de uma população de microrganismos, e possibilita identificar a diversidade microbiana presente em diferentes ecossistemas, incluindo aqueles não cultiváveis, e isso sem a necessidade de cultivar cada microrganismo presente de forma individual (CASE *et al.*, 2007; HANDELSMAN *et al.*, 2004). Segundo Stanley *et al.* (2016), quando coletadas amostras representativas de qualquer meio, estas podem ser estudadas quanto à diversidade da comunidade microbiana presente, sua estrutura e interação dinâmica. Métodos clássicos de microbiologia são menos eficazes em detectar os desequilíbrios da microbiota intestinal, principalmente pela dificuldade de cultivo de muitos microrganismos (MCSWEENEY; MACKIE 2012), necessitando de meios de cultura e ensaios específicos para o cultivo, além de apresentar alto custo financeiro, e tempo elevado para identificar diversas espécies em uma amostra. Uma

alternativa para corrigir esse bloqueio é o emprego de técnicas moleculares, que são mais acuradas, demandam menor tempo para a análise e possibilitam a identificação de centenas de espécies simultaneamente (SANTOS; CORÇÃO, 2012), além de apresentarem menor custo, pois são identificados microrganismos em uma só análise, com custo único.

No ano de 2000, dois principais métodos de sequenciamento de DNA clássico foram utilizados (GONG *et al.*, 2008). O método de Sanger, e o método de Maxam-Gilbert, envolvendo clivagem química, sendo este último, pouco utilizado. O método de Sanger, método de detecção óptica, por fluorescência, foi o método de referência no período citado, porém, não é mais comumente utilizado (DICK *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2002). É baseado em nucleotídeos especiais, chamados de terminadores de cadeia, capazes de terminar a fita de DNA (KIRCHER *et al.*, 2010). Este método apresenta alta confiabilidade, porém, é lento, apresenta baixo *throughput*, baixa produtividade, sequenciando poucos genomas (KUNIN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a tecnologia molecular mais utilizada é o Next Generation Sequencing (NGS), uma técnica de alto rendimento, que fornece análise em larga escala com profundidades, e apresenta redução de custos (SHAUFI *et al.*, 2015; GONG *et al.*, 2008). A técnica somada à variedade de ferramentas disponíveis em bioinformática (*softwares*), possibilitaram análises múltiplas de genomas, com custo reduzido, se comparado aos métodos anteriores (GOLDBERG *et al.*, 2015; MARDIS *et al.*, 2008). Segundo Heather e Chain (2016), através da NGS é possível gerar informações sobre milhões de pares de bases (pb) em uma única corrida. Os autores relatam sobre a técnica possuir o grande diferencial de proporcionar o sequenciamento direto e paralelo de milhões de moléculas de DNA, aumentando consideravelmente a escala e a resolução das análises, além de reduzir a quantidade de amostras necessárias.

O rRNA (RNA ribossomal) é encontrado em todos os organismos vivos. O 16S rRNA é uma região específica do gene que é altamente conservada em bactérias, mas varia em sequência entre diferentes espécies, sendo esta região do genoma amplamente utilizada na análise filogenética e na identificação de bactérias, através do sequenciamento (AKHTAR *et al.*, 2008). Técnicas da biologia molecular utilizam este gene como uma impressão digital, capaz de classificar e identificar microrganismos (HUME *et al.*, 2006). Utilizando-se um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores, ou chamados de *primers*, mais precisamente V3 e V4, específicos de

regiões dentro do gene 16S rRNA, para amplificar a região conservada deste gene pela técnica PCR (reação em cadeia da polimerase), obtém-se *amplicons* que podem ser separados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (THOMPSON *et al.*, 2008). O DGGE foi utilizado pela primeira vez na década de 90, por Muyzer e Ramsing (1995), para caracterizar microbiotas e, a partir de então, tem sido utilizado como ferramenta para pesquisar componentes de ecossistemas complexos, incluindo a microbiota intestinal de frangos de corte (OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2006; PEDROSO *et al.*, 2006), e galinhas poedeiras, tendo ainda poucos estudos envolvendo estas.

As tecnologias de NGS começaram a ser comercializadas a partir de 2004 e vêm evoluindo rapidamente. Como explica Delseny *et al.* (2010), essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Os autores trazem a informação que a empresa *Illumina* disponibilizou no mercado seu primeiro sequenciador de segunda geração no ano de 2006, e, assim, como nos sequenciadores que utilizam a técnica de Sanger, os sequenciamentos na plataforma *Illumina* são feitos por meio de PCR com DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados por diferentes fluoróforos.

Se tratando de saúde animal, as mudanças na microbiota intestinal dos animais não são facilmente monitoradas usando-se métodos tradicionais, como a cultura microbiológica (APAJALAHTI *et al.*, 2001). Possibilitar análises detalhadas dessa microbiota levariam a uma melhor compreensão da biodiversidade local e suas interações microbianas, o que é de suma importância para a implementação de estratégias capazes de melhorar a saúde intestinal, logo, melhorar o desempenho produtivo dos animais (SHAUF *et al.*, 2015). A microbiota intestinal de frangos de corte já foi estudada anteriormente, usando diferentes técnicas, inclusive, com o método tradicional de cultivo microbiológico, o qual se mostrou tendencioso e impreciso, pois a maioria das bactérias não foram cultivadas, devido a requisitos de crescimento desconhecidos (WEI *et al.*, 2013). Estudos anteriores mostraram que apenas 60% da microbiota intestinal era cultivável (SHAUF *et al.*, 2015). A tecnologia de sequenciamento de Sanger também foi utilizada pelos autores Lu *et al.*, (2003) para estudar a sucessão da microbiota intestinal de frangos. Embora estas técnicas citadas foram mais conclusivas do que o método de cultura bacteriana, elas ainda eram incapazes de representar a microbiota intestinal com maior precisão (STANLEY

et al., 2016; ZOETENDAL *et al.*, 2004). Além disso, essas técnicas eram demoradas e caras. Nos últimos anos, devido a abordagens metagenômicas baseadas em métodos de sequenciamento de alto rendimento, a pesquisa da microbiota intestinal progrediu rapidamente (MILANI *et al.*, 2013; MANCABELLI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2020), podendo se ter maiores informações sobre o microbioma. Além disso, a ampla aplicação de tecnologias relacionadas à metagenômica, descobriu a relação entre a microbiota intestinal e doenças de vários sistemas (KAZEMIAN *et al.*, 2020; CHENG *et al.*, 2020).

Esta metodologia torna-se uma ferramenta importante, uma vez que ela pode ser utilizada como uma triagem inicial para identificação do perfil bacteriano de determinado ecossistema, e servir como ponto de partida para investigações microbiológicas, útil para melhorar a segurança alimentar e controlar doenças aviárias. Pesquisas futuras envolvendo metagenômica precisam ser realizadas para avaliar a composição da microbiota intestinal de galinhas poedeiras, e poder explorar as consequências funcionais das diferentes composições microbianas encontradas.

2.5.1 Alfa e beta diversidade

A alfa diversidade é uma medida utilizada na ecologia para descrever a diversidade de espécies, dentro de um único local ou área (BASELGA; ORME, 2012). Se refere à variedade de espécies presentes em um determinado ecossistema, considerando a riqueza de espécies e a equitabilidade, ou seja, como essas espécies estão distribuídas, em termos de abundância relativa (DELSENY *et al.*, 2010). A diversidade alfa pode ser considerada como o produto da diferenciação de nichos entre espécies que ocupam um mesmo *habitat*. Existem várias métricas que podem ser utilizadas para se calcular a diversidade alfa (THOMPSON *et al.*, 2008). As mais utilizadas são através dos índices Shannon-Wiener e ACE.

Além da alfa diversidade, existe outra medida para se calcular a diversidade microbiológica, a beta diversidade (BASELGA; ORME, 2012). Esta é uma medida utilizada na ecologia para quantificar a diferença ou dissimilaridade entre duas ou mais comunidades, em termos de sua composição de espécies (LOU; OREJA, 2012). A beta diversidade pode ser calculada de várias maneiras, dependendo da abordagem e dos dados disponíveis. Algumas das métricas mais comuns usadas para calcular a

beta diversidade, é o escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) (SELVARAJ *et al.*, 2021).

Para se calcular o índice de Shannon-Wiener, de acordo com Cava *et al.* (2015) é necessário determinar o número total de indivíduos na comunidade e o número de espécies presentes (onde “N” é o total de indivíduos e “S”, o número de espécies). É calculada a proporção de indivíduos representada por cada espécie, e em seguida, divide-se o número de indivíduos de cada espécie (denominado “n”), pelo número total de indivíduos, N. Essa proporção é representada por “p”, onde: $p = n / N$. É calculado, então, o valor de $-p * \ln(p)$ para cada espécie. Aqui, $\ln$ representa o logaritmo natural. Esta fórmula é aplicada a todas as espécies presentes na comunidade, onde, $-p * \ln(p)$. Então, o índice de Shannon-Wiener (representado por H') é calculado por $H' = -\text{Somatório de } (-p * \ln(p))$. O resultado final, representa a diversidade. Quanto maior o valor de H' , maior é a diversidade no local (CAVA, 2015). Este índice é sensível ao tamanho da amostra, portanto, para comparações entre comunidades, é necessário que as amostras sejam de tamanhos semelhantes (YAQOOB *et al.*, 2021).

Já para realizar o cálculo de nMDS, técnica estatística utilizada para visualizar a dissimilaridade ou a distância entre objetos ou amostras em um espaço de menor dimensão, referente a beta diversidade, de acordo com os autores Knight *et al.* (2018), é necessário definir, inicialmente, a matriz de dissimilaridade ou distância entre as amostras. Os autores mencionam que essa matriz pode ser calculada usando uma medida de dissimilaridade adequada para seus dados, como distância euclidiana, a distância de Bray-Cutis ou outra medida apropriada. É necessário certificar-se de que a matriz esteja no formato de distâncias e seja simétrica. Existem várias abordagens e algoritmos disponíveis para realizar o nMDS, como o algoritmo de Krusal ou o algoritmo de Shepard (NAECK *et al.*, 2014). É especificado o número de dimensões para a projeção do nMDS, e normalmente é utilizada um número pequeno de dimensões, entre 2 e 3, para ser possível a visualização dentro de um gráfico. Segundo os autores Naeck *et al.* (2014), é executado o algoritmo de nMDS na matriz de dissimilaridade, considerando o número de dimensões de escolha. Após, os resultados são plotados do nMDS em um gráfico bidimensional (ou tridimensional) usando as coordenadas obtidas nas dimensões reduzidas. Cada amostra será representada por um ponto no gráfico, e a distância ou dissimilaridade entre as amostras deve ser mantida o mais fiel possível (RAMIREZ *et al.*, 2017). A visualização resultante permitirá uma representação gráfica das relações de dissimilaridade entre

as amostras, facilitando a interpretação e análise dos dados. Após concluído o gráfico, de modo geral, quanto maior a distância entre os pontos, maior a dissimilaridade entre eles.

Neste contexto, este estudo se propõe a caracterizar e comparar a microbiota intestinal de galinhas poedeiras tratadas com enramicina, antibiótico convencional e com melhoradores de desempenho não convencionais (produtos comerciais denominados de T1 e T2) em diferentes etapas do ciclo produtivo e frente a temperaturas ambientais fora da zona de conforto térmico destes animais.

3 ARTICLE: METAGENOMIC ANALYSIS OF THE GUT MICROBIOTA OF LAYING HENS UNDER CALORIC STRESS TREATED WITH PERFORMANCE ENHANCERS

The results of this thesis are presented in manuscript form with formatting according to the journal *Anais da Academia Brasileira de Ciências* to which it will be submitted.

Authors:

Camila Ceccato Ferreira (<https://orcid.org/0009-0003-6101-8888>) ^{1*}

Lenita de Cássia Moura Stefani (<https://orcid.org/0000-0002-0814-8726>) ^{2, 3, 5}

Denise Nunes Araujo (<https://orcid.org/0000-0001-9606-5447>) ³

Miklos Maximiliano Bajay (<https://orcid.org/0000-0002-8196-3524>) ^{4,5}

Marcel Manente Boiago (<https://orcid.org/0000-0002-0950-4577>) ³

Aleksandro Schafer da Silva (<https://orcid.org/0000-0001-5459-3823>) ^{3, 5}

Tayse Zanin (<https://orcid.org/0000-0003-2334-7341>) ¹

Alessandra da Silva Santos (<https://orcid.org/0000-0002-2710-4569>) ⁵

Antony Comin (<https://orcid.org/0009-0004-8596-6126>) ⁶

Bruno Milhoreto Sponchiado (<https://orcid.org/0000-0001-9974-7769>) ⁶

Paulo Vinícius de Oliveira Júnior (<https://orcid.org/0000-0001-7496-9314>) ⁶

^{1*} Graduate Program in Animal Science, Higher Education Center (CEO), Santa Catarina State University (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

² Department of Scientific and Technological Education, Distance Education Center, CEAD, UDESC, Florianópolis, SC, Brazil.

³ Department of Animal Science, CEO, UDESC, Chapecó, SC, Brazil.

⁴ Department of Fisheries Engineering and Biological Sciences, Southern Region Higher Education Center, CERES, UDESC, Laguna, SC, Brazil.

⁵ Multicentric Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology (PMBqBM), Center for Agro-Veterinary Sciences, CAV, UDESC, Lages, SC, Brazil.

⁶ Undergraduate student, Department of Animal Science, CEO, UDESC, Chapecó, SC, Brazil.

Section of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences (AABC) to which the manuscript belongs: Animal Science.

^{1*} Correspondence author c.ceccato@hotmail.com.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the gut microbiota of laying hens treated with antibiotic and natural performance enhancers, subjected to natural caloric stress. For that, laying hens (n=140, Hy-Line Brown, 15-week-old) were divided into 4 groups with 7 repetition: 1. Control (C); Enramycin (E); 3. Alternative Treatment 1 (500 g/ton of feed, T1); 4. Alternative Treatment 2 (250 g/ton of feed, T2). Cloacal swabs (n=112) were collected and labeled as: T0/Control; T1, peak of laying; T2, third cycle; T3, end of the third cycle, for the metagenomic analysis. Significant difference in microbiological diversity ($P \leq 0.0304$) was observed at time T3, higher than other times, and without interference regarding treatments. The genus *Enterococcus* spp. was predominant at all times and treatments (77.96%), with a reduction in T3 ($P \leq 0.00027$). The genus *Corynebacterium* spp. showed an increase in T3 (136%) compared to T0 ($P \leq 0.00039$), demonstrating a strong relationship with the caloric stress. In T3 there was greater microbiological diversity, even under heat stress ($P \leq 0.0304$) with treatments E, T1 and T2, showing similar results to each other, It is possible to conclude that T1 and T2 treatments showed similar effects to conventional antibiotic regarding the intestinal microbiota.

Keywords: Caloric Stress; Genome Sequencing; Growth Promoter; Gut Modulation; Poultry.

3.1 INTRODUCTION

The global production of eggs for human consumption grew exponentially in 2021, according to the Food and Agriculture Organization of the United States, reaching 87.60 million tons with an increase of 26.78% when compared to 2010. The projection for the future is encouraging with the prospect of increased production. Likewise in Brazil, where the egg production and per capita consumption have intensified in recent years.

Nonetheless, Brazil still has opportunities for growth in the sector. An alternative to improve poultry productivity and performance is the use of performance enhancers (RAMA *et al.*, 2023). As an example, we can mention antibiotics. Largely used in the diet of commercial farm in subclinical dosage they are able to control pathogens in the digestive tract. However, there is currently concern about the health of consumers of these food products and with bacterial resistance (MAIORKA *et al.*, 2009). Some countries, including Brazil, prohibited the use of antibiotics, which were done only for therapeutic purposes (BRASIL, 2016). As a result, several substitutes for performance enhancers have been studied, such as essential oils (EOs), probiotics, prebiotics and organic acids. Nevertheless, when it comes to gut modulation, their effect still have gaps for study.

In order to characterize gut microbiota of poultry and have greater clarification of the impact of the use of non-conventional performance enhancers, advanced cultivation techniques are mandatory. However, traditional cultivation techniques, such as cell culture, presented some limitations since many microorganisms are not detected by this method due to the difficulty of cultivation. As a way to amend this limitation, it is necessary to use molecular techniques. A relatively recent alternative is the metagenomic analysis using Next-Generation Sequencing (NGS) based on the bacterial 16S rRNA gene. Therefore, the research aims to characterize the gut microbiota of laying hens, evaluate the effects of conventional (enramycin) and non-conventional (two commercial products based on natural compounds) performance enhancers on the modulation of the microbiota towards natural caloric stress in the view of the scarce numbers of studies.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Facilities and Experimental Design

The experiment was performed in between July and December 2022, in the experimental shed of the State University of Santa Catarina – UDESC, in Chapecó/SC, located at latitude 27°09' S, longitude 52°61'W, altitude 670 m. The climate is humid subtropical, with relatively warm summers and cool winters.

For the sampling, 140 15-week-old Hy-Line Brown laying hens were used and housed in metabolic cages (5 birds/cage) made of galvanized steel, with gutter feeders and nipple drinkers. The diet used was formulated from corn and soybean meal, according to the nutritional requirements of laying hens, based on the food chemical composition and energy values, as proposed by Rostagno (2017) (Table 1).

Table 1 – Composition of the basal feed supplied to laying hens.

Ingredients	g/ Kg
Corn	653.13
Soybean Meal 45%	213.33
Calcitic Limestone	93.35
Dicalcium Phosphate	12.64
Soybean Oil	16.72
DL-methionine 98%	2.75
L-lysine 78%	0.49
L-threonine 99%	0.43
NaCl (Common salt)	5.10
Premix	2.00

Source: Rostagno, 2017. (Ingredient – g/ Kg). Premix composition per kilogram of basal diet: choline chloride: 100 g; selenium: 80 mg; cobalt: 100 mg; iodine: 396 mg; copper: 4 g; zinc: 33,88 g; iron: 20 g; manganese: 39,68 g; vitamin A : 3.600.000 IU; vitamin D3 : 800.000 IU; vitamin E : 7.200 IU; vitamin K3: 0,8 g; vitamin B1 : 0,71 g; vitamin B2 : 2,64 g; vitamin B3: 3,92 g, vitamin B5: 11,88 g; vitamin B6 : 1,176 g; vitamin B12 : 6 mg; folid acid: 0,4 g; biotin: 40 mg.

The animals were randomly divided into 4 treatments and 7 repetitions, 5 birds/ cage: 1. Control (without antibiotic, C); 2. Enramycin (E); 3. Alternative Treatment 1 (250 g/ton of feed, T1); 4. Alternative Treatment 2 (500 g/ ton, T2), with T1 consisting of plant extracts (7% of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde), also cinnamon and

oregano EO, yeast wall, a pool of beneficial bacteria (probiotics) and organic minerals. On the other hand, Compound T2 consists of oregano EO, cinnamon, turmeric and organic acids. Enramycin and the alternative treatments were incorporated into the basal feed of the treatment groups. Enramycin was chosen because it is the most frequently used antimicrobial agent in animal production in Brazil, with active registration as a growth promoter, according to MAPA's IN No. 44, 2015 (BRASIL, 2015).

A total of 112 cloacal swabs were collected (1 swab per cage, collected from 5 birds), using a cotton swab, as demonstrated in figure 1, at different times: T0/Control: start of laying; T1: peak of laying/start of the second cycle; T2: start of the third cycle; T3, end of the third cycle where T0/Control – collected before the beginning of the treatment, 18 weeks old poultry; T1 – representing the peak of laying and the beginning of the second cycle, 25 weeks old poultry; T2 – 31 weeks old poultry; T3: end of the third cycle and the experiment, 34 weeks old poultry. The swab samples were kept frozen at -20°C , stored at the Molecular Biology, Immunology and Microbiology Laboratory (LABMIM) at UDESC – Chapecó, where they were kept until the end of the experiment and, afterwards, sent to BPI Biotechnology for DNA extraction and sequencing.

Figure 1 – Cloacal Swab Collection.



The minimum and maximum temperatures were also recorded daily, always at the end of the day, using a digital thermometer, which was also inside the experimental poultry shed, recording the daily temperature variations.

This research was approved by the Animals Ethics Committee (CEUA) of the Santa Catarina State University (UDESC), under the protocol 9641230522.

3.2.2 Metagenomic Analysis

The total DNA was extracted using Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research), according to the manufacturer's protocol. After extraction, 1ng of DNA was used for the development of sequencing libraries. The sequencing libraries of 16S rRNA were prepared using the universal primers V3/V4 (WANG *et al.*, 2009), in a PCR reaction protocol (CAPORASO *et al.*, 2010). The PCR reaction were performed in a final volume of 20 μ L, containing 10 μ L of GoTaq® Green PCR Master Mix (Promega), 1 μ L of forward oligonucleotide at 10 μ M, 1 μ L of reverse oligonucleotide at 10 μ M, 2 μ L of genomic DNA and ultrapure sterile water sufficient for 20 μ L. For amplification, high-performance sequencing of the universal V3/V4 regions of the 16S rRNA was performed using the primers described in Table 2.

Table 2 – Oligonucleotide sequences used in amplification.

Initializer	Sequence 5' – 3'
16s V3-V4-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGG GNGGCWGCAG
16s V3-V4-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTAC HVGGGTATCTAATCC

The amplification program consisted of initial denaturation at 95° C for 3 min, followed by 27 cycles of denaturation at 95° C per 30 sec., annealing at 55° for 30 sec., extension at 72 °C for 30 sec. and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplification reactions were conducted in a Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) thermocycler. After the amplification reaction of each sample, the amplification was confirmed by electrophoresis in 2% agarose gel stained with 0,03% (v/v) UniSafe Dye.

In the indexing reaction step, the indexers were inserted into common adapters, which are necessary for cluster generation and sequencing the samples. The indexing reaction was performed following the protocol of the Nextera XT Index (Illumina) Kit. The amplification program consists of: incubation at 72 °C for 3 min, initial denaturation

at 95° C for 30 sec, followed by 12 cycles of 95 °C for 10 sec, 55 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec and the final extension at 72 °C for 5 min. The amplification reactions were conducted in a Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

The libraries generated were submitted to a purification and quantification step, initially using magnetic Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter), to remove smaller fragments from the total population of molecules and the primers residual. On the other hand, the quantification was performed using the Real-Time PCR methodology and the KAPA-KK4824 Kit (Library Quantification Kit - Illumina/Universal) and the QuantStudio 3 equipment (Applied Biosystems), all steps according to the manufacturer's protocol. An equimolar pool of DNA was generated by normalizing all samples at 4 nM for sequencing, which was conducted using the Illumina MiSeq NGS system (Illumina® Sequencing) and the MiSeq Reagent 500 cycles kit - 2x 250pb read. At the end of the sequencing step, the generated file, called BCL, was converted into a FASTQ file using Illumina platform. The DNA sequences of the microorganisms were analyzed using a customized pipeline, considering a maximum of 1% accumulated error in the sequencing. In order to use suitable amplicons for metagenomic analysis, the Illumina FASTQ files were filtered to a size 283 bp, discarding smaller reads or those containing residues of the Illumina adapter sequence.

The output files from the Illumina *software* were used as input files for the analysis performed using the Galaxy platform, with a Mothur software (version 1.48.0) (KOZICH *et al.*, 2013), and R. The DNA sequences of the microorganisms were analyzed, considering a maximum of 1% accumulated error in the sequencing. The FASTQ files were filtered by discarding smaller reads or those containing residues of the Illumina adapter sequence. Identical read sequences (100% identity) were grouped into oligotypes to remove possible erroneous reads, chimeric amplicon readings and very short or long sequences.

The classification of the taxonomic level of reads was performed with the SILVA database (RICHTER *et al.*, 2015). Only sequences with at least 99% identity with the database were used for classification.

3.2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed in R statistical software (version R 3.6.0), using Phyloseq package (MCMURDIE *et al.*, 2013).

The alpha diversity was calculated using the `plot_richness` function of the Phyloseq R package, with standard parameters and represented through ACE richness estimator, the Shannon-weaver microbiological diversity indices and Simpson similarity index. The beta diversity used abundances of normalized proportions, as described by Weiss and collaborators (2017). The Bray-Curtis dissimilarity and the weighted UniFrac were calculated using the Phyloseq distance functions. Correlation coefficients between same groups used average proportions of taxonomy within each group.

For the four bacterial genera that had the highest populations (*Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Gallibacterium* spp. and *Pseudomonas* spp.), an analysis was made of the variation in the number of individuals as a function of time (T1, T2, T3) and the treatment applied (C, E, T1 and T2), according to a completely randomized design (CRD) with a 3 x 4 factorial arrangement, comparing with time T0 and treatment C, with 7 repetition each and a total of 84 sampling units. Initially, the analysis of variance (ANOVA) was applied with a 5% significance level, and when significant differences were noticed in between the treatments, Tukey's test of means was applied, between the times and treatments applied, and Dunnet's test comparing all treatments with T0 and C, both at 95% probability level. Statistica software (version 10.0) was used.

The environment temperatures of the experimental cages were measured and recorded daily, always at the end of the day, using a digital thermometer, which took readings of the minimum and maximum temperatures reached day after day. Minimum and Maximum temperatures were averaged for each time period (T0, T1, T2 and T3).

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

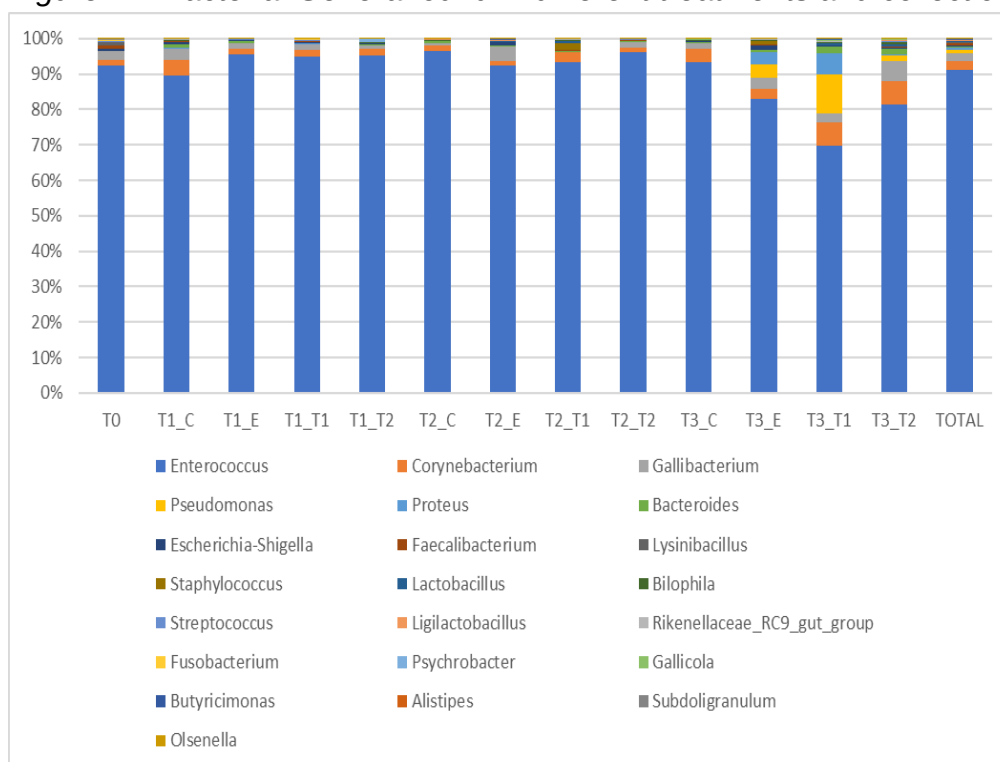
After sequencing, approximately 3.202.309 sequence *reads* were obtained from the amplified fragment. The diversity of gut microbiota were estimated using diversity and richness indices, with Shannon and Simpson diversity and ACE richness parameters, generated by R statistical software.

A total of 15 phyla were identified in the intestinal microbiome analyzed, and 13,92% of the sequences were identified as unclassifiable at the phylum level. Among the classified phyla, there was a predominance of *Firmicutes* (79,42%), *Proteobacteria* (3,55%), *Actinobacteriota* (2,31%), *Bacteroidota* (0,61%), *Desulfobacterota* (0,14%)

and *Fusobacteriota* (0,05%), which represent 86,08% of the identified phyla in the gut microbiota. The other 10 phyla found in the samples represent a smaller percentage: *Synergistota* (0,015%); *Campylobacterota* (0,013%); *Verrucomicrobiota* (0,0084%); *Deferribacterota* (0,0029%); *Elusimicrobiota* (0,0011%); *Patescibacteria* (0,0002%); *Deinococcota* (0,0001%); *Planctomycetota* (0,0001%), and *Gemmatimonadota* (0,0001%).

Among the genera found, also considering all the groups, the main ones that can be mentioned: *Enterococcus* spp. (phylum *Firmicutes*), 77.96% prevalence; *Corynebacterium* spp. (*Actinobacteriota*), 2.22%; *Gallibacterium* spp. (*Proteobacteria*), 1.92%; *Pseudomonas* spp. (*Proteobacteria*), 0.76%; *Proteus* spp. (*Proteobacteria*), 0.45%; *Bacteroides* spp. (*Bacteroidota*), 0.42%; *Escherichia-Shigella* spp. (*Proteobacteria*), 0.35% and *Lactobacillus* spp. (*Firmicutes*), 0,27%. Figure 2 shows all the known genera found in the swabs samples. The classification of genera according to the times of each collection (time T0, T1, T2 and T3) and in the different treatments (C, E, T1 and T2) highlighting a strong prevalence of *Enterococcus* spp., regardless of time and treatment.

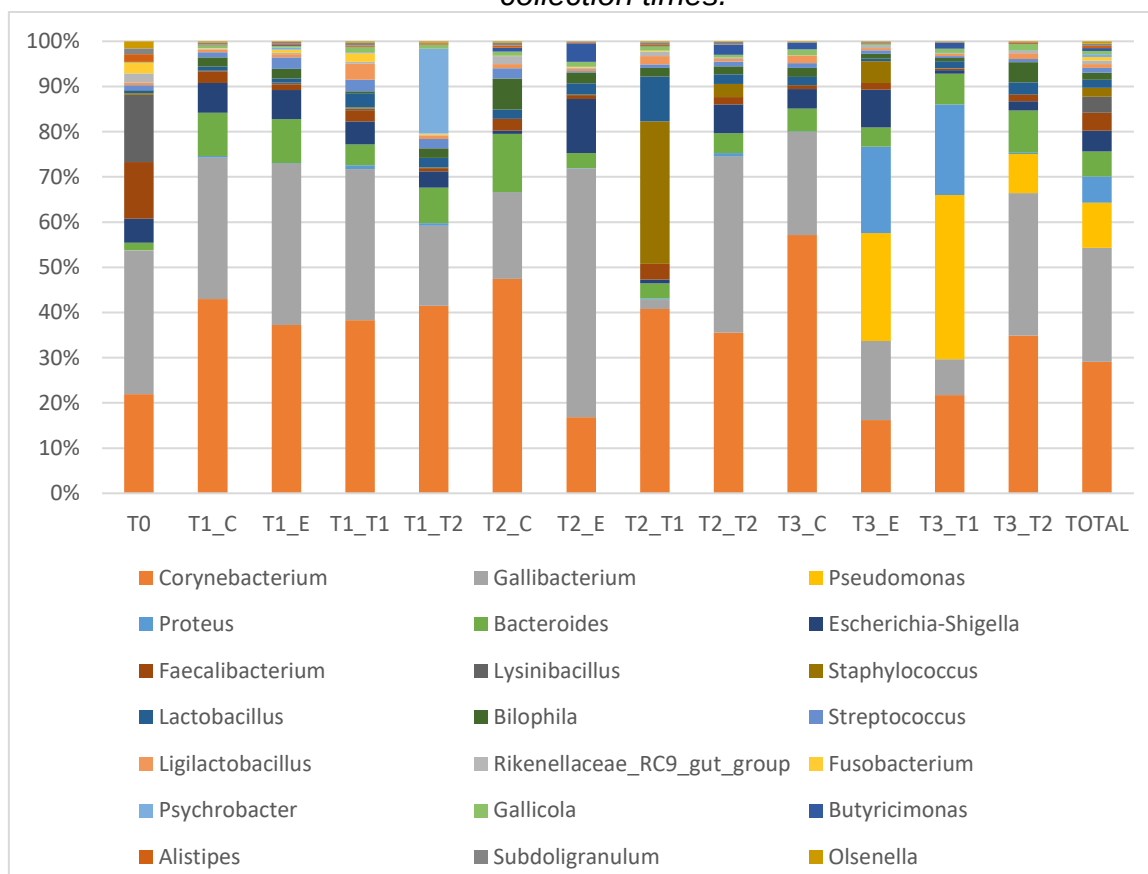
Figure 2 – Bacterial Genera found in different treatments and collection times.



Where: % abundance of each genus; time_treatment.

Besides *Enterococcus* spp., which stood all in all groups, figure 3 shows the prevalence of the other genera involved, also according to the collection times and different treatments.

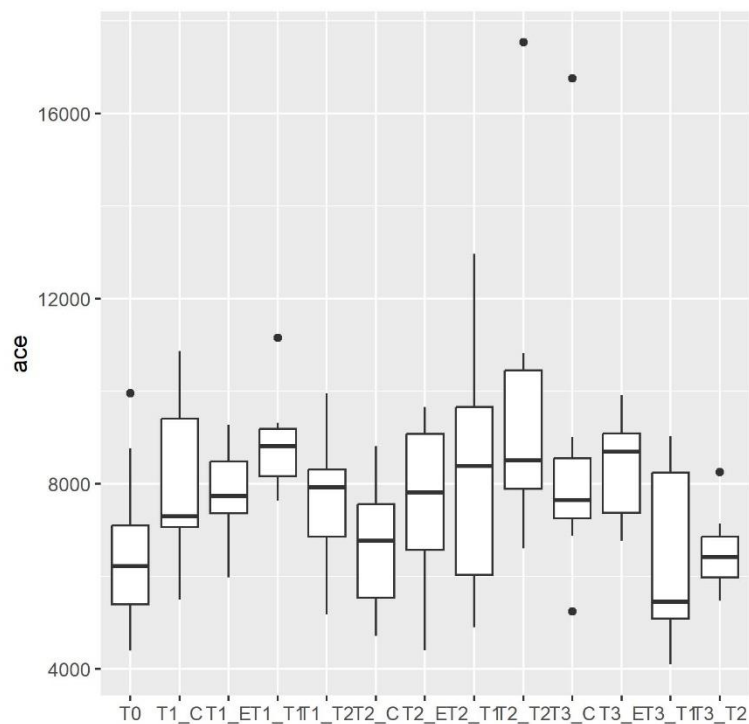
Figure 3 – Prevalence of other bacterial genera according to the treatments and collection times.



Where: % abundance of each genus; time_treatment.

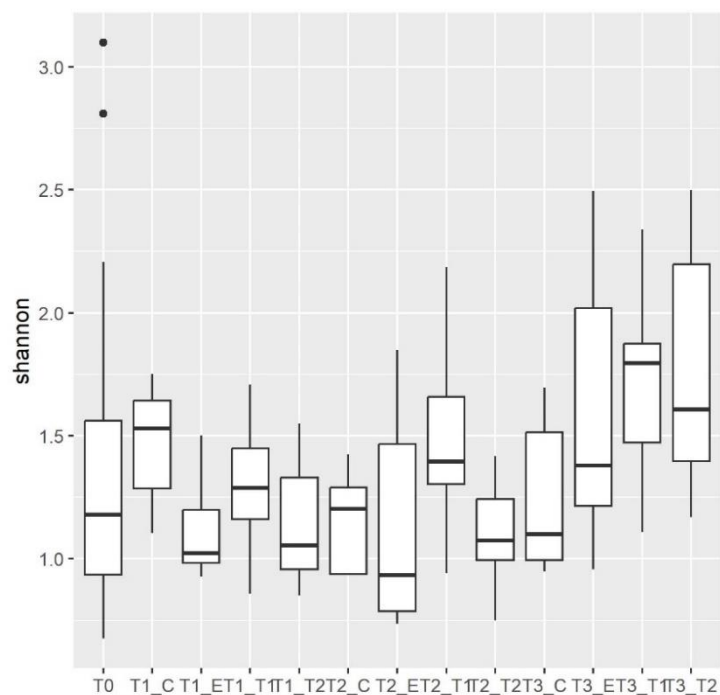
In order to estimate alpha diversity in terms of the richness of the genera found, the ACE richness index was used, which is illustrated in Figure 4, indicating that time T2 (collection at 31 weeks) showed a higher richness in terms of the number of individuals compared to the other groups ($P \leq 0,0023$). There were no significant differences regarding treatments ($P \geq 0,05$).

Figure 4 – ACE index estimating the richness of individuals found, according to time and treatment.



To represent the diversity of the genera found, the Shannon index was estimated, as illustrated in Figure 5.

Figure 5 – Shannon index estimating the diversity of the genera found, according to time and treatment.



Assuming the understanding that the closer the points are, more similar they are to each other, the graphs shows that data was grouped both by collection times and by treatment, and suggests that collection times T3 and T2 had higher similarities

than the other times. T0 was considered a contradictory result, also highlighted by Shannon index.

For the largest populations observed in the research (*Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Gallibacterium* spp. and *Pseudomonas* spp.), there were no significant differences ($P \geq 0,05$) regarding the number of individuals as a function of time and treatment, for *Gallibacterium* spp. and *Pseudomonas* spp. with the average values of $515,8 \pm 1111$ and $289,9 \pm 1694$, respectively. As for *Enterococcus* spp. ($P \leq 0,00027$) and *Corynebacterium* spp. ($P \leq 0,00039$), there were no significant differences in the number of individuals found as a function of time, as described in Table 3, where *Enterococcus* spp. had a decrease over time, and *Corynebacterium* spp. had an increase over the course of the collection periods, more precisely in T3. There were no significant differences between treatments for these genera ($P \geq 0,05$). It is important to mention that the company supplying the poultry for this study provided probiotics before they were housed at the University, at 15 weeks old. This probiotics composition: *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*.

Table 3 – Number of individuals of the genera *Enterococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. as a function of time.

Collection Time	<i>Enterococcus</i> spp. (nº of individuals)	<i>Corynebacterium</i> spp. (nº of individuals)
T0	24559.1 ± 6769	446.7 ± 841
T1	23622.2 ± 3844 a	620.4 ± 449 b
T2	22821.5 ± 5012 a	408.9 ± 408 b
T3	18157.2 ± 6885 b *	1055.1 ± 856 a *

Where: Average $\pm$ standard deviation. Averages followed by the same lowercase letter in each column do not differ by the Tukey test. * indicates significant difference in between the average number of individuals in the treatment and the average number in the control group, using Dunnett Test (all of them at a 95% probability level).

For *Enterococcus* spp. it can be noted that the population was significantly reduced at time T3, differing from times T1 and T2 ($P \leq 0,00027$), which did not differ from each other. Only T3 differed from T0, with a population reduction of 26%. A research with laying hens performed by Dai *et al.*, (2022), showed that colonization of the intestinal tract by *Firmicutes* occurs in the early stages of the bird's life, and has a significant increase after 2 weeks of life, around 67,38% more than in the previous

step. This percentage increases over the course of the bird's life, until it reaches the initial laying phase, where *Firmicutes* becomes the predominant phylum in the intestinal microbiome, and is stabilized from this point. After the start of laying, although it is still one of the predominant phyla, its concentration drops considerably. In this phylum, the *Enterococcaceae* family stands out (BALLOU *et al.*, 2016; DAI *et al.*, 2020). The genus *Enterococcus* spp., like the other representatives of the phylum *Firmicutes*, has an important role in the intestine. According to Peng *et al.*, (2020), these microorganisms can ferment the non-digestible carbohydrates in the diet into short-chain fatty acids, such as butyric acid, providing energy to increase the intestinal barrier and are highly related to feed efficiency in poultry. In addition, studies consider the genus *Enterococcus* spp. to be part of the beneficial microbiota of poultry, related to animal health, presenting probiotics effects, which increase the height of the villi in the ileum and decreases the multiplication of *Salmonella* due to the production of bacteriocin (KRAIMI *et al.*, 2018; BORDA-MOLINA *et al.*, 2020). It is estimated that colonization of the intestinal tract is composed of up to 90% of beneficial bacteria, such as those in *Firmicutes* phylum, under normal conditions. Additionally, Li *et al.* (2017) reported that the physiology of layer hens changes significantly around the laying period, with increased lipid metabolism and nutrient utilization driving the succession of the gut microbiota, and endocrine and sex hormone changes related to this phase can also strongly influence the gut microbiota in laying hens (LUMPKINS *et al.*, 2008).

For *Corynebacterium* spp the opposite of *Enterococcus* spp. was noticed, where the lowest population were observed for times T1 and T2, which did not differ from each other and did not differ from T0 ($P \geq 0,005$). For time T3, that differed significantly from the other times, there was a 136% increase in population compared to T0 ($P \leq 0,00039$).

For the other genera that stood out in the research, *Gallibacterium* spp. and *Pseudomonas* spp., although they did not show differences regarding time and treatment, the presence of these microorganisms is also related to the beneficial microbiota. The *Proteobacteria* phylum, to which these genera belong, is the most predominant phylum in the initial phase of laying hens (BALLOU *et al.*, 2016; DAI *et al.*, 2020). Intestinal colonization with a predominance of *Proteobacteria*, may be related to the activation of the intestinal immune response system and the promotion of the development of the immune system, according to the authors Oakley *et al.*, (2014). It is expected for the predominance to consistently decrease until the birds

reach the laying period (DAI *et al.*, 2022). It is physiologically expected that their occurrence would be moderated at all collection times, due to the age of the birds.

Other important genera found in T3, even though they were not statistically different from the other groups ($P \geq 0,05$), will be discussed below, since according to the indices, this was the time when the diversity of the microbiome presented higher numbers ($P \leq 0,0304$). They are *Proteus* spp., *Bacteroides* spp., *Escherichia-Shigella* and *Lactobacillus* spp. The *Proteus* spp. genus, especially *P. mirabilis* species, which belongs to the Enterobacteriaceae family, has the ability to migrate and easily grow, and is widespread in the intestines of animals and in the environment, such as water and soil (MA *et al.*, 2022). They are considered pathogenic microorganisms, which can cause extraintestinal clinical diseases such as urinary tract infections, and are frequently isolated in broiler feces (GOING *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2021), and naturally resistant to a large number of antibiotics (LU *et al.*, 2021). The authors Girlich *et al.* (2020) argued that several pathogens could cause food intoxication in humans, with poultry products being the focus of contamination. Besides that, this genus is also related to contamination of samples and laboratory facilities, as noticed by the authors, due to its ease of movement and fast spread in culture media. In this research, although this microorganism was present at all times and treatments, it only increased at T3_E and T3_T1, without showing an increase in the same treatments, at other times. The animals also showed no clinical signs throughout the experiment. It is understood that in this case, it refers to conflicting results, with a strong indication of sample contamination.

Bacteroides spp are considered beneficial bacteria that are part of the intestinal microbiome of animals, contributing to the balance of the environment (XIONG *et al.*, 2023). They have an important role in the digestion and intestinal health of birds, found in basically every age category, supporting to break down complex dietary components, such as fibers and polysaccharides, and in the production of short-chain fatty acids (KHAN *et al.*, 2020). In addition, the authors Xiong *et al.* (2023) noticed the dysbiosis caused in intestinal microbiological diversity of birds by the use of antibiotics when in face of stress, caused by different forms, including caloric stress, leading to a decrease in the population of *Bacteroides* spp., which directly affects the health of the birds. It was possible to notice an increase of this microorganism in the T3_T1 and T3_T2, decreasing in T3_E and in control T3_C, indicating that the use of the antibiotic enramycin may cause a local dysbiosis, with a decrease in *Bacteroides* spp., as the

T1 and T2 treatments seem to correct this failure, maintaining the levels of the microorganism higher, even when exposed to caloric stress at T3.

Lactobacillus spp., as well as *Enterococcus* spp., are beneficial bacteria, according to Rasaei *et al.* (2023), responsible for fermenting sugars into lactic acid, which favors an acidic and healthy environment in the poultry's GIT, where is commonly found throughout the life of laying hens (VIDENSKA *et al.*, 2014). Wang *et al.* (2016) noticed that these microorganisms fight pathogens in the GIT, such as *Salmonella*, reducing contamination levels, as well as strengthening the host's immune system and reducing occurrence of clinical signs of intestinal diseases in broilers. In poultry, the intestinal modulation caused by *Lactobacillus* spp. is still inconclusive. In this research, an increase was noticed in T2_T1, T3_T1 and T3_T2, with a decrease in T3_C, the control group, and a major decrease in T3_E, the group containing enramycin, where the presence of the microorganism was almost non-existent. The results suggests once again that alternative treatments can help to increase the beneficial microbiota, even in situations of caloric stress, as the use of the antibiotic enramycin can cause dysbiosis in the area.

3.3.1 Caloric Stress

Table 4 below shows the average maximum and minimum temperatures registered at the different swab collection times.

Table 4 – Average temperatures (maximum and minimum) registered in different times.

Time	Temperatures (°C)	
	Maximum (°C)	Minimum (°C)
T0	24.2	14.2
T1	25.9	17.1
T2	26.9	18.6
T3	31.1	19.6

Where: T0 – poultry exposed to the registered average maximum and minimum temperatures, for 10 days; T1 – exposure for 42 days; T2 – exposure for 42 days; T3 – exposure for 21 days.

With the strong heat waves in period T3, it is understood that this may be a factor that led to the appearance of *Corynebacterium* spp., registered in greater

abundance in this period ($P \leq 0,00039$). The microorganism can be considered pathogenic and immunosuppressive, causing skin lesions in some cases (LI *et al.*, 2023), especially when there are predisposing factors, such as those related to stress. The gut microbiota of laying hens tends to remain stable during the laying period, without major fluctuations in its composition in normal situations, as explained by the authors DAI *et al.*, (2022). However, the birds become more sensitive in terms of their health during this period, more vulnerable to health challenges due to the high demands made on them to achieve productivity. In addition, stress factors such as high temperatures increase these challenges, leaving the animals even more susceptible to damage. The temperature within the range of thermal comfort for laying hens is 15 °C to a maximum of 25 °C (TUMOVA; GOUS, 2012), which was not possible to achieve at time T3, reaching 31 °C on average.

3.4 CONCLUSION

From all the information, it can be concluded that the main genera found were independent of time and treatments, with the exception of *Enterococcus* spp. and *Corynebacterium* spp., which differed according to collection time. *Enterococcus* spp. was predominant in all treatments and times (77,96%), even though its concentration decreased mainly at time T3 ($P \leq 0,00027$). There was a significant presence of *Corynebacterium* spp. ($P \leq 0,00039$) in T3, with a 136% increase compared to T0, with a strong relation to the heat stress challenge to which the birds were subjected, reaching 31,1 °C on average during the period. Although there was a significant increase in diversity in T3 ($P \leq 0,0304$), the other genera found, such as *Gallibacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Bacteroides* spp. and *Lactobacillus* spp., had no significant difference in their occurrence between the groups ($P \geq 0,05$). However, the presence of beneficial bacteria was higher in treatments T1 and T2, and lower in control treatments C and E, with enramycin, indicating that these alternative treatments may be able to balance the gut microbiota, even under caloric stress, as the use of antibiotics suggests that they cause dysbiosis. The treatment factor had no significant difference in the prevalence of genera and numbers of individuals at any time ($P \geq 0,05$). Therefore, the effects of using non-conventional performance enhancers suggests that they are positive, as noticed through the characterization of the gut microbiota during the period of submission to caloric stress (T3), which did not show a significant

difference with the enramycin group. This result means that it is a possible substitute for the antibiotics, as well as indicate a possible balance in the microbiota, not noticed with the use of conventional enhancer. For the characterization of the gut microbiota of laying hens during the different phases of the productive cycle, there were no greater fluctuations ($P \geq 0,05$), besides the *Enterococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. genera, already mentioned. When it comes to intestinal modulation in laying hens, more studies are needed in relation to other factors and with attempts to correlate zootechnical performance.

Acknowledgements

The authors appreciate the funding institutions of the experiment: Tecphy®, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Santa Catarina Research and Innovation Foundation (FAPESC) and the Santa Catarina State University (UDESC).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a caracterização da microbiota intestinal de galinhas poedeiras não apresenta grandes oscilações quanto a composição durante as diferentes fases do ciclo produtivo, mesmo com a utilização de melhoradores de desempenho convencionais e não convencionais. A utilização dos tratamentos alternativos testados sugere possuir efeito simbiótico na microbiota intestinal, à medida que o melhorador de desempenho enramicina, tende a provocar uma disbiose no local. As aves quando submetidas ao estresse calórico natural, mesmo em frente ao desafio, apresentaram maior diversidade microbiológica, quando comparadas aos demais períodos, ficando os tratamentos alternativos T1 e T2, com resultados similares ao tratamento E, com o antibiótico, tendendo ainda, a mostrarem um microbioma mais equilibrado, sendo possíveis bons substitutos aos antibióticos. Mais estudos envolvendo modulação intestinal de galinhas poedeiras com melhoradores de desempenho alternativos precisam ser realizados.

REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2021**. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2018/10/relatorio-anual-2021.pdf>>. Acesso em: março de 2023.

ABD EL-HACK, M. E.; ABDELNOUR, S. A.; TAHA, A. E. *et al.* Herbs as thermoregulatory agents in poultry: An overview. **Science of the Total Environment**. v. 703, p.134-51, 2020.

ABDEL-MONEIM, A. M. E.; SHEHATA, A. M.; KHIDR, R. E. *et al.* Nutritional manipulation to combat heat stress in poultry – A comprehensive review. **Journal of Thermal Biology**. v. 98, p. 1502-18, 2021.

AGIRMAN, G.; YU, K.B.; HSIAO, E.Y. Sinalizando a inflamação através do eixo intestino-cérebro. **Science**. v. 374, p. 1087-92, 2021.

AGUS, A.; PLANCHAIS, J.; SOKOL, H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. **Cell Host Microbe**. v. 23. p. 716-24, 2018.

AHMAT, M.; CHENG, J.; ABBAS, Z. *et al.* Efeitos de *Bacillus amyloliquefaciens* lfb112 no desempenho de crescimento, características de carcaça, resposta imunológica e bioquímica sérica em frangos de corte. **Antibiotics**. v. 10, p. 1427, 2021.

AKHTAR, N.; GHOURI, M. A.; IQBAL, A. *et al.* Biodiversidade e análise filogenética de bactérias cultiváveis indígenas da mina de sal Khewra, Paquistão e sua importância industrial. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 301-17, 2008.

ALAGAWANY, M.; IBRAHIM, Z. A.; ABDEL-LATIF, E. A. *et al.* Use of *Aspergillus japonicus* culture filtrate as a feed additive in quail breeder's nutrition. **Italian Journal of Animal Science**. v. 19, p. 1289-96, 2020.

ALALI, W. Q. Effect of essential oil compound on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Poultry Science**. v. 92, p. 836-41, 2013.

ALMONÁCIDO, D. E.; KRAAL, L.; OSSANDON, F. J. *et al.* 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. **Plos One**. v. 12, p. 1371-86, 2017.

APAJALAHTI, J.H.; KETTUNEN, A.; BEDFORD, M.R. *et al.* Percent G+ C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 5656-67, 2001.

ARAÚJO, J.C.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**. v.1, p. 69-77, 2007.

ARMANINI, E.H.; BOIAGO, M.M.; CÉCERE, B.G.D.O. *et al.* Protective effects of silymarin in broiler feed contaminated by mycotoxins: growth performance, meat antioxidant status, and fatty acid profiles. **Tropical Animal Health and Production**. v. 53, p. 442, 2021.

BALLOU, A. L.; ALI, R. A.; MENDOZA, M. *et al.* Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. **Front Veterinary Science**. v. 2, p. 201-11, 2016.

BARRETO, M. S. R.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M. Plant extracts used as growth promoters in broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.10, p.109-15, 2008.

BASELGA, A.; ORME, C. D. L. Betapart: an R package for the study of beta diversity. **Methods in Ecology and Evolution**. v. 3, p. 808-12, 2012.

BENDAHOU, M.; BENYOUCEF, M.; BENKADA D. *et al.* Influência dos processos de extração no óleo essencial de *Origanum glandulosum*. **Journal Applied Science**. v. 7, p. 1152-57, 2007.

BOLER, B.M.V.; FAHEY, G.C. JR. Prebiotics of Plant and Microbial Origin. **Direct-Fed Microbials and Prebiotics for Animals**. v. 7, p. 13-26, 2012.

BONA, T. D.; PICKLER, L.; MIGLINO, L. B. *et al.* Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, p. 411-18, 2012.

BONATO, M.; BORGES, L. L.; INGBERMAN, M. *et al.* Effects of yeast cell wall on immunity, microbiota, and intestinal integrity of *Salmonella* infected broilers. **Journal of Applied Poultry Research**. v. 29, p. 545-58, 2020.

BORDA-MOLINA, D.; ROTH, C.; HÉRMANDEZ-ARRIAGA, A. *et al.* Effects on the Ileal Microbiota of Phosphorus and Calcium Utilization, Bird Performance, and Gender in Japanese Quail. **Animals**. v. 10, p. 885-99, 2022.

BOSETTI, G. E.; GRIEBLER, L.; ANIECEVSKI, E. *et al.* Microencapsulated carvacrol and cinnamaldehyde replace growth-promoting antibiotics: Effect on performance and meat quality in broiler chickens. **Anais...Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 3, 2020.

BURT, S. Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e aplicações potenciais em alimentos - uma revisão. **International Journal Microbiol. Alimentar**. v. 94, p. 223-253. 2004.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Fitoterapia**. 2020. Monografias expandidas da Comissão E., Comunicações de Medicina Integrativa, MA. p. 519.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 44, de 15 de dezembro de 2015**. Diário Oficial da União, Brasília 19 de dezembro de 2015. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 45, de 21 de outubro de 2016**. Diário Oficial da União, Brasília 25 de outubro de 2016. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 45, de 26 de julho de 2018**. Diário Oficial da União, Brasília 31 de julho de 2018. Seção 1.

BRITO, A. N. E. F.; KANEKO, I. N.; CAVALCANTE, D. T. Hydroxy-selenomethionine enhances the productivity and egg quality of 50- to 70-week-old semi-heavy laying hens under heat stress. **Poultry Science**. v. 102, p. 503-22, 2023.

BRUGALETTA, G.; TEYSSIER JR.; ROCHELL, S.J. *et al.* A review of heat stress in chickens. Part I: Insights into physiology and gut health. **Frontiers Physiology**. v. 13, p. 934-51, 2022.

CAO, Y.; XUN, M.; REN, S. *et al.* Effects of dietary organic acids and probiotics on laying performance, egg quality, serum antioxidants and expressions of reproductive genes of laying ducks in the late phase of production. **Poultry Science**. v. 101, p. 102-33, 2022.

CAPORASO, J.; LAUBER, C.; WALTERS, W. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Biological Sciences**. v. 108, p. 4516-22, 2010.

CARVALHO, R.D.S.; CARVALHO, W.A. Eritromicina, azitromicina e claritromicina. In: Silva, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 105, p. 1059-71. 2002.

CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DALLOF, I. *et al.* Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 801-28, 2007.

CAVA, M. B.; CORRONCA J. A.; COSCARÓN, M. D. Comparison of arthropod communities on the Apipé Grande Island, the Chaco Húmedo and the Selva Paranaense in the province of Corrientes, Argentina. **Revista Mexicana de Biodiversidad**. v. 86, p. 370-76, 2015.

CHEN, X.; HU, Y.; YUAN, X. *et al.* Effect of early enteral nutrition combined with probiotics in patients with stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 76, p. 592-603, 2022.

CHENG, S.; HAN, B.; DING, M. *et al.* Identifying psychiatric disorder-associated gut microbiota using microbiota-related gene set enrichment analysis. **Briefings in Bioinformatics**. v. 21, n. 3, p. 1016-22, 2020.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T. *et al.* Antioxidantes fenólicos de orégano clonal (*Origanum vulgare*) com atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*. **Processo Bioquímico**. v. 40, p. 809-16, 2005.

CRUZ, L. C. F.; COSTA, T. F.; SAMPAIO, S. A. *et al.* Intestinal microbiome of birds and its importance. **Research, Society and Development**. v. 11, p. 224-34, 2022.

CRYAN, J.F.; O'RIORDAN, K.J.; COWAN, C.S. *et al.* The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**. v. 73, p. 573-787, 2019.

DAI, D.; QI, G.; WANG, J. *et al.* Intestinal microbiota of layer hens and its association with eggs quality and safety. **Poultry Science**. v. 101, p. 102-40, 2022.

DAI, D.; WU S.G.; ZHANG, H.J. *et al.* Dynamic alterations in early intestinal development, microbiota and metabolome induced by in ovo feeding of L-arginine in a layer chick model. **Journal Animal Science Biotechnology**. v. 11, p. 228-39, 2020.

DÍAZ-SÁNCHEZ, S.; HANNING, I.; PENDLETON, S. *et al.* Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety. **Poultry Science**. v. 92, p. 562-72, 2013.

DELSENY, M.; HAN, B.; HSING, Y. I. *et al.* High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. **Plant Science**. v. 179, p. 407-22, 2010.

DICK, G. J.; ANDERSSON, A. F., BAKER, B. J. Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. **Genome Biology**. v. 10, p. 85-96, 2009.

DITTOE, D. K.; RICKE, S. C.; & KIESS, A. S. Organic acids and potential for modifying the avian gastrointestinal tract and reducing pathogens and disease. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 5, p. 216, 2018.

DONG, X.Y.; AZZAM, M.M.M.; ZOU, X.T. *et al.* Effects of dietary threonine supplementation on intestinal barrier function and gut microbiota of laying hens. **Poultry Science**. v. 96, p. 3654-63, 2017.

DOSOKY, W. M.; ZEWEIL, H.S.; AHMED, M.H. *et al.* Impacts of onion and cinnamon supplementation as natural additives on the performance, egg quality, and immunity in laying Japanese quail. **Poultry Science**. v. 100, p. 101-32, 2021.

ELGEDDAWY, S.A.; SHAHEEN, H.M.; EL-SAYED, Y.S. *et al.* Effects of the dietary inclusion of a probiotic or prebiotic on florfenicol pharmacokinetic profile in broiler chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 104, p. 549-57, 2020.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION**. Disponível em: <
[https://www.fao.org/brasil/noticias/pt/?page=2&ipp=5&tx_dynalist_pi1\[par\]=YToxOntzOjE6lkwiO3M6MToiOSI7fQ==>](https://www.fao.org/brasil/noticias/pt/?page=2&ipp=5&tx_dynalist_pi1[par]=YToxOntzOjE6lkwiO3M6MToiOSI7fQ==>). Acesso em: março de 2023.

FENG, J.; LU, M.; WANG, J. *et al.* Dietary oregano essential oil supplementation improves intestinal functions and alters gut microbiota in late-phase laying hens. **Journal Animal Science Biotechnology**. v. 12, p. 231-46, 2021.

FU, Y.; HU, J.; CHENG, H. W. *et al.* Research Note: Probiotic, *Bacillus subtilis*, alleviates neuroinflammation in the hippocampus via the gut microbiota-brain axis in heat-stressed chickens. **Poultry Science**. v. 102, p. 601-23, 2023.

FURLAN, R. L. Probióticos e prebióticos no desenvolvimento morfofisiológico do trato gastro-intestinal. In: CONFERÊNCIA FACTA 2010 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2010, Santos, **Anais...** Santos: FACTA, p. 229-37, 2010.

GADDE, U.; KIM, W. H.; OH, S. T. *et al.* Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal Health Research Reviews**. v. 18, p. 26-45, 2017.

GALLI, G. M.; GERBET, R. R.; GRISS, L. G. *et al.* Combination of herbal components (curcumin, carvacrol, thymol, cinnamaldehyde) in broiler chicken feed: Impacts on response parameters, performance, fatty acid profiles, meat quality and control of coccidia and bacteria. **Microbial Pathogenesis**. v. 139, p. 103-19, 2020.

GIERALTOWSKI, L.; HIGA, J.; PERALTA, V. *et al.* National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella Heidelberg* Infections Linked to a Single Poultry Company. **Plos One**. v. 11, p. 1202-12, 2016.

GIRLICH, D.; BONNIN, L.; DORTET T. *et al.* Genetics of acquired antibiotic resistance genes in *Proteus spp.* **Frontiers in Microbiology**. v. 11, p. 256-69, 2020.

GODOI, M. J. S.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S. *et al.* Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37. p. 601-18, 2008.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R.J. *et al.* 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 59, p. 147-57, 2008.

GONG, Z.; SHI, X.; BAI, F. *et al.* Characterization of a novel diarrheagenic strain of *Proteus mirabilis* associated with food poisoning in China. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p. 2810, 2019.

GOLDBERG, B.; SICHTIG, H.; GEYER, C. *et al.* Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next generation sequencing in infectious disease diagnostics. **ASM Microbe**. v. 6, p. 407-28, 2015.

HAFEZ, H.M.; ATTIA, Y.A. Challenges to the poultry industry: current perspectives and strategic future after the COVID-19 outbreak. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 7, p. 516-27, 2020

HAN, Z.; WILLER, T.; PIELSTICKER, C. *et al.* Differences in host breed and diet influence colonization by *Campylobacter jejuni* and induction of local immune responses in chicken. **Gut Pathogens**. v. 56. p. 79-85. 2021.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 68, p. 669-85, 2004.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**. v. 107, p. 1-8, 2016.

HOFACRE, C.L.; BERGHAUS, R.D.; JALUKAR, S. *et al.* Efeito de uma preparação de parede celular de levedura na colonização cecal e ovariana com salmonela enteritidis em poedeiras comerciais. **Journal of Applied Poultry Research**. v. 27, p. 453-60, 2018.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Melhoria na vida de prateleira e segurança de alimentos perecíveis por óleos essenciais vegetais e antimicrobianos de fumaça. **International Journal of Microbiology Alimentar**. v. 22, p. 273-92. 2005.

HUME, M.E.; CLEMENTE-HERNANDEZ, S.; OVIEDO-RONDON, E.O. *et al.* Effects of feed additives and mixes *Eimeria* species infection on intestinal microbial ecology of broilers. **Poultry Science**. v.85, p.2106-11, 2006.

HUNG, C.C; GARNER, C.D.; SLAUCH, J.M. *et al.* The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. **Molecular Microbiology**. v. 87, p. 1045–60, 2018.

HUTKINS, R.W.; KRUMBECK, J.A.; BINDELS, L.B. *et al.* Prebiotics: why definitions matter. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 37, p. 1-7, 2016.

JAMALKANDI, S.A.; AHMADI, A.; AHRARI, J. *et al.* Oral and nasal probiotic administration for the prevention and alleviation of allergic diseases, asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nutrition Research Reviews**. v. 34, p. 1-16, 2021.

JANCZYK, P.; HALLE, B.; SOUFFRANT, W. B. *et al.* Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. **Poultry Science**. v. 88, p. 2324–32, 2009.

JONES, F. T.; RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. **Poultry Science**. v. 82, p. 613-17, 2003.

KAZEMIAN, N.; MAHMOUDI, M.; HALPERIN, F. *et al.* Gut microbiota and cardiovascular disease: opportunities and challenges. **Microbiome**. v. 8, p. 1-17, 2020.

KERS, J.G.; VELKERS, F.C.; FISCHER, E.A. *et al.* Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. **Frontiers in microbiology**. v. 9, p. 235-51, 2018.

KHAJEH BAMI, M.; AFSHARMANESH, M.; EBRAHIMNEJAD, H. *et al.* Effect of dietary *Bacillus coagulans* and different forms of zinc on performance, intestinal microbiota, carcass and meat quality of broiler chickens. **Probiotics and antimicrobial proteins**. v. 12, p. 461-72, 2020.

KHAN, S.; MOORE, R. J.; STANLEY, D. *et al.* The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety. **Applied Environmental Microbiology**. v. 13, p. 86-93, 2020.

KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing—concepts and limitations. **Bioessays**. v. 32, p. 524-31, 2010.

KNIGHT, R.; VRBANAC, A.; TAYLOR, B.C. Best practices for analysing microbiomes. **Nature Review Microbiology**. v. 16, p. 410–22, 2018.

KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T. *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**. ed. 79, v. 17, p. 5112-20, 2013.

KRAIMI, N.; CALANDREAU, L.; BIESSE, M. *et al.* Absence of Gut Microbiota Reduces Emotional Reactivity in Japanese Quails. **Frontiers in Physiology**. v. 9, p. 603-21, 2018.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A. *et al.* A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 93, 557-78., 2008.

LEE, K.W.; EVERTS, H.; BEYNEN, A.C. *et al.* Essential oils in broiler nutrition. **International Journal of Poultry Science**. v. 3, p. 738-52, 2004.

LEHTORANTA, L.; LATVALA, S.; LEHTINEN, M.J. *et al.* Role of probiotics in stimulating the immune system in viral respiratory tract infections: A narrative review. **Nutrients**. v. 12, p. 3163, 2020.

LEI, C.; SUN, R.; XU, G. *et al.* Enteric VIP-producing neurons maintain gut microbiota homeostasis through regulating epithelium fucosylation. **Cell Host Microbe**, v. 30, p. 1417-34, 2022.

LI, Z.; SANG, Q. Q.; SUN, Y. X. Exploring the effect of the microbiota on the production of duck striped eggs. **Poultry Science**. v. 102, p. 436-49, 2023.

LIEM, A.; PESTI, G. M.; EDWARDS, H. M. *et al.* The effect of several organic acids on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chicks. **Poultry Science**. v. 87, p. 689-93, 2008.

LIU, M.; LU, Y.; GAO, P. *et al.* Effect of curcumin on laying performance, egg quality, endocrine hormones, and immune activity in heat-stressed hens. **Poultry Science**. v. 99, p. 2196-02, 2020.

LORENÇON, L.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C. *et al.* Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v. 29, p. 151-58, 2007.

LOPES, K.L.A.M. **Suplementação de glutamina em dietas iniciais para frangos de corte**. 2008, 30f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás/ Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiás, 2008.

LOU, J.; OREJA, J. A. G. Midiendo la diversidad biológica: más allá del índice de Shannon. **Acta Zoologica Mexicana**. v. 56, p. 3-14, 2021.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B. *et al.* Diversity and succession of the intestinal bacterial 61hicken61e of the maturing broiler hicken. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, p. 601-32, 2003.

LU, J.; ZHAO, K.; XIE, H. *et al.* Identification and characterization of a novel SXT/R391 integrative and conjugative element in a *Proteus mirabilis* food isolate. **Foodborne Pathogens**. v. 18, p. 727-32, 2021.

LUAN, S.J.; SUN, Y.B.; WANG, Y. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* spray improves the growth performance, immune status, and respiratory mucosal barrier in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 98, p. 1403-09, 2019.

LUMPKINS, B.; BATALLA, A.; DALE, N. Use of Distillers Dried Grains Plus Solubles in Laying Hen Diets. **Journal Applied to Poultry Reserchers**. v. 14, p. 25–31, 2008.

MA, S.; SHEN, J.; XU, Y. Epidemic characteristics of the SXT/R391 integrated conjugative elements in multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolated from chicken farm. **Poultry Science**. v. 102, p. 640-57, 2022.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F. *et al.* Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**. v. 12, p. 483-92, 2009.

MANCABELLI, L.; MILANI, C.; LUGLI, G. A. *et al.* Unveiling the gut microbiota composition and functionality associated with constipation through metagenomic analyses. **Science Reports**. v. 7, p. 9879, 2017.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. v. 9, p. 387-402, 2008.

MARGOLIS, K.G.; CRYAN, J.F.; MAYER, E.A. *et al.* The microbiota-gut-brain axis: from motility to mood. **Gastroenterology**. v. 160, p. 1486-1501, 2021.

MCMURDIE, P.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive and Graphics of Microbiome Census Data. **Plos One**. v. 8, p. 61217, 2013.

MCSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Micro-organisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. **Background Study Paper**. v 61, p. 1-62, 2012.

MENCH, J.A.; SUMMER, D.A.; ROSEN-MOLINA, J.T. *et al.* Sustainability of egg production in the United States – The policy and market chicken. **Journal of Poultry Science**. v. 90, p. 229-40, 2011.

MIGLIORINI, M.J.; BOIAGO, M.M.; STEFANI, L.M. *et al.* Oregano essential oil in the diet of laying hens in winter reduces lipid peroxidation in yolks and increases shelf life in eggs. **Journal of Thermal Biology**. v. 85, p. 102-27, 2019.

MIKULSKI, D.; JANKOWSKI, J.; NACZMANSKI, J. *et al.* Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. **Poultry Science**. v. 91, p. 2691-700, 2012.

MILLANI, C.; HEVIA, A.; FORONI, E. *et al.* Avaliando a microbiota fecal: um protocolo otimizado de análise baseado em genes de torrent 16S rRNA. **Plos One**. v. 8, p. 687-702, 2013.

MITSCH, P.; ZITTERL-EGLSEER, K.; KÖHLER, B. *et al.* The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestine of broiler chickens. **Journal of Poultry Science**. v. 83, p. 669-75, 2004.

MOLOSSE, V. L.; DEOLINDO, G. L; GLOMBOSKY, P. *et al.* Curcumin or microencapsulated phytogenic blend to replace ionophore and non-ionophore antibiotics in weaned calves: Effects on growth performance and health. **Livestock Science**. v. 263, p. 105-29, 2022.

MÖRKEL, S.; BUTLER, M.I.; HOLL, A. *et al.* Probiotics and the microbiota-gut-brain axis: focus on psychiatry. **Current Nutrition Reports**. v. 9, p. 171-82, 2020.

MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science and Technology**. v. 32, p. 1-9, 1995.

NAECK, R.; D'AMORE, D.; CHAMPION, M. F. M. Indice de diversité du sommeil pour l'analyse de la fragmentation du sommeil. **Revue des Maladies Respiratoires**. v. 31, p. 33-42, 2014.

NOLAN, J.K.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. *et al.* Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 8421-31, 2005.

OAKLEY, B.B.; LILLEHOJ, H.S; KOGUT, M.H. *et al.* The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS Microbiology Letters**. v. 360, p. 100-12, 2014

OCEJO, M.; OPORTO, B.; HURTADO, A. *et al.* 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-

growing chickens throughout their productive lifespan. **Scientific Reports**. v. 9, p. 2506, 2019.

OLADEJI, I.S.; ADEGBENRO, M.; OSHO, I.B. *et al.* The efficacy of phytogenic feed additives in poultry production: a review. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**. v. 7, p. 2038-41, 2019.

OLGUN, O.; ABDULQADER, A. F.; & KARABACAK, A. *et al.* The importance of nutrition in preventing heat stress at poultry. **World's Poultry Science Journal**. v. 77, p. 661-78, 2021.

OVIEDO-RONDÓN, E.O.; HUME, M.E.; HERNÁNDEZ, C. *et al.* Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. **Poultry Science**. v. 85, p. 854-60, 2006.

PANDIT, R.J.; HINSU, A.T.; PATEL, N.V. *et al.* Microbial diversity and community composition of caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA amplicon sequencing. **Microbiome**. v. 115, p. 8109-22, 2018.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. *et al.* Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poultry Science**. v. 85, p. 747-52, 2006.

PENG, W.; HUANG, J.; YANG, J. *et al.* Integrated 16S rRNA sequencing, metagenomics, and metabolomics to characterize gut microbial composition, function, and fecal metabolic phenotype in non-obese type 2 diabetic. **Front Microbiology**. v. 10, p. 3141, 2020.

PERIĆ, L.; ŽIKIĆ, D.; LUKIĆ, M. *et al.* Application of alternative of growth promoters in broiler production. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, p. 387-97, 2009.

POWELL, N.; WALKER, M.M.; TALLEY, N.J. *et al.* The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 14, p. 143-59, 2017.

PRICE, M.; DEHAL, P.; ARKIN, A. FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **Plos One**. v. 5, p. 9490-01, 2010.

QIN, Q.; LI, Z.; ZHANG, M. *et al.* Effects of melittin on production performance, antioxidant function, immune function, heat shock protein, intestinal morphology, and cecal microbiota in heat-stressed quails. **Poultry Science**. v. 102, p. 102-16, 2023.

QUIGLEY, E.M.M. Microbiota-brain-gut axis and neurodegenerative diseases, **Current Neurology and Neuroscience Reports**. v. 17, p. 94, 2017.

RAMA, E. N.; BAILEY, M.; KUMAR, S. *et al.* Characterizing the gut microbiome of broilers raised under conventional and no antibiotics ever practices. **Journal of Poultry Science**. v. 102, p. 439-44, 2023.

RAMÍREZ, M. G.; CABALLERO, S. Z.; HERNÁNDEZ, C. P. *et al.* Diversity analysis of *Coleoptera* in the tropical dry forest of Acahuizotla, Guerrero, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**. v. 88, p. 381-88, 2017.

RAHIMI, S.; KATHARIOU, S.; FLETCHER, O. *et al.* Effect of direct-fed microbiota and prebiotic on performance and intestinal histomorphology of turkey poult challenged with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Poultry Science**. V. 98, p. 6572-78, 2019.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; OLIVER GLÖCKNER, F. *et al.* Species WS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**. v. 32, p. 929-31, 2015.

ROSENTHAL, Z.; PATEL, L. Earth just experienced one of its warmest summers on record. **The Washington Post**. v. 88, p. 1078-89, 2022.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4.ed. Viçosa, MG: UFV, DZO, 2017.

RUEGG, S.R.; HASLER, B.; ZINSSTAG, J. *et al.* Integrated Approaches to Health: A Handbook for the Evaluation of One Health. **Wageningen Academic Publishers**. Cap. 3, p. 39-85. 2018.

RZEZNITZECK, J.; HOERR, F.J.; RYCHLIK, I. *et al.* Morphology, microbiota, and metabolome along the intestinal tract of female turkeys. **Poultry Science**. v. 101, p. 102046, 2022.

SAEED, M.; BABAZADEH, D.; ARIF, M. *et al.* Silymarin: a potent hepatoprotective agent in poultry industry. **World's Poultry Science Journal**. v. 73, p. 483-92, 2019.

SALAH, F.D.; SOUBEIGA, S.T.; OUATTARA, A.K. *et al.* Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. In Lomé, Togo. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v. 8, p. 1-8, 2019.

SANTOS JÚNIOR, A.A.; FERKET, P.R. Fatores dietéticos que afetam a saúde intestinal e a colonização por patógenos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2007 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos, **Anais...** Santos: FACTA, p. 143-59, 2007.

SANTOS, I.I.; CORÇÃO, G.; KESSLER, A.M. *et al.* Microbiota ileal de frangos de corte submetidos a diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V. 41, ed. 3, p. 643-47, 2012.

SAXENA, S.; SAXENA, V.K.; TOMAR, S. *et al.* Characterization of caecum and crop microbiota of Indian indigenous chicken targeting multiple hypervariable regions within 16S rRNA gene. **Poultry Science**. v. 57, p. 381-9, 2016.

SCICUTELLA, F.; MANNELLI, F.; DAGHIO, M. *et al.* Polyphenols and organic acids as alternatives to antimicrobials in poultry rearing: a review. **Antibiotics**. v. 10, p. 1010, 2021.

SCUPHAM, A.J. Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, p. 136-47, 2007.

SELVARAJ, A.; VALLIAMAI, A.; MURUGANATHAN, P. *et al.* *Sapindus mukorossi* and bioactivity metabolic oleic acid impedes methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation by down regulating adhesion genes expression. **Microbiological Research**. v. 242, p. 126-38, 2021.

SHANG, Y.; KUMAR, S.; OAKLEY, B. *et al.* Chicken gut microbiota: importance and detection technology. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 5, p. 254, 2018.

SHAUFI, M.A.M; SIEO, C.C.; CHONG, C.W. *et al.* Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**. v. 7, p. 591-07, 2015.

SHI, Y.; ZOU, J.; ZHANG, X. *et al.* Network pharmacology exploration reveals a common mechanism in the treatment of cardio-cerebrovascular disease with *Salvia miltiorrhiza* Burge. And *Carthamus tinctorius* L. **BMC Complement Medicine and Therapies**, v. 20, p. 351, 2019.

SINGH, V.; ROTH, S.; LLOVERA, G. *et al.* Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke. **Journal of Neuroscience**. v. 36, p. 7428-40, 2016.

STANLEY, D.; MASON, L.J.; MACKIN, K.E. *et al.* Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. **Nature Medicine**. v. 22, p. 1277-84, 2016.

STANLEY, D.; HUGHES, R.J.; MOORE, R.J. *et al.* Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 98, p. 4301–10, 2014.

STEFANELLO, C.; ROSA, D. P.; DALMORO, Y. K. *et al.* Protected blend of organic acids and essential oils improves growth performance, nutrient digestibility and intestinal health of broiler chickens undergoing an intestinal challenge. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 6, p. 491, 2020.

SURAI, P.F.; KOCHISH, I.I.; FISININ, V.I. *et al.* Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. **Antioxidants**. v. 8, p. 235, 2019.

SUGANUMA, K.; HAMASAKI, T.; HAMAOKA, T. *et al.* Effect of dietary direct-fed microbial and yeast cell walls on cecal digesta microbiota of layer chicks inoculated with nalidixic acid resistant *Salmonella Enteritidis*. **Poultry Science**. v. 100, p. 1013-29, 2021.

TAYLOR, A.L.; MURPHREE, R.; INGRAM, L.A. *et al.* Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Associated with Mechanically Separated Chicken at a Correctional Facility. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 12, p. 950-2, 2015.

TEKCE, E.; GÜL, M. Effects of Origanum Syriacum Essential Oil on Blood Parameters of Broilers Reared at High Ambient Heat. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 19, p. 655-62, 2017.

THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on Salmonellas in the crop. **British Poultry Science**, v. 38, p. 59-65, 1997.

THOMPSON, K.; BURKHOLDER, K.; PATTERSON, J. *et al.* Microbial ecology shifts in the ileum of broilers during feed withdrawal and dietary manipulations. **Poultry Science**, v. 87, p.1624-32, 2008.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V. *et al.* Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549-54, 2005.

TŮMOVÁ, E.; GOUS, R.M. Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. **Poultry Science**, v. 91, p. 1269-75, 2012.

UYANGA, V.A.; WANG, M.; TONG, T. *et al.* L-citrulline influences the body temperature, heat shock response and nitric oxide regeneration of broilers under thermoneutral and heat stress condition. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 671-91, 2021.

UYANGA, V.A.; OKE, E.O.; AMEVOR, F.K. *et al.* Functional roles of taurine, L-theanine, L-citrulline, and betaine during heat stress in poultry. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, p. 1-20, 2022.

VENKITANARAYANAN, K.; KOLLANOOR-JOHNNY, A.; DARRE, M. J. *et al.* Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. **Journal of Poultry Science**, v. 92, p. 493-501, 2013.

VIDENSKA, P.; SEDLAR, K.; LUKAC, M. *et al.* Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. **Plos One**, v. 9, p. 514-21, 2014.

VOSS-RECH, D.; KRAMER, B.; SILVA, V. S. *et al.* Longitudinal study reveals persistent environmental Salmonella Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Veterinary Microbiology**, v. 233, p. 118-23, 2019.

WANG, Y.; QIAN, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Plos One**, v. 4, p. 1401-22, 2009.

WANG, H.W.; WANG, Y.P. Gut microbiota-brain axis. **Chinese Medicine Journal**, v. 129, p. 2373-80, 2016.

WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. *et al.* Bacterial census of poultry intestinal microbiome. **Poultry Science**, v. 92, p. 671-83, 2013.

WEISS, S.; XU, Z.; PEDDADA, S. *et al.* Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**. v. 27, p. 491-507, 2017.

WISTEDT, A.; RIDDERSTRÅLE, Y.; WALL, H. *et al.* Exogenous estradiol improves shell strength in laying hens at the end of the laying period. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 56, p. 1-11, 2014.

WU, I.W.; GAO, S.S.; CHOU, H.C. *et al.* Integrative metagenomic and metabolomic analyses reveal severity-specific signatures of gut microbiota in chronic kidney disease. **Theranostics**. v. 10, p. 5398-411, 2020.

XIANG, Q.; WANG, C.; ZHANG, H. *et al.* Effects of different probiotics on laying performance, egg quality, oxidative status, and gut health in laying hens. **Animals**. v. 9, p. 1110, 2019.

XIONG, X.; XU, J.; YAN, X. Gut microbiome and serum metabolome analyses identify biomarkers associated with sexual maturity in quails. **Poultry Science**. v. 102, p. 762-779, 2023.

XU, Y.; YANG, H.; ZHANG, L. *et al.* High-throughput sequencing technology to reveal the composition and function of cecal microbiota in Dagu chicken. **BMC Microbiology**. v. 259, p. 607-29, 2016.

YAQOOB, M.U.; ABD EL-HACK, M.E.; HASSAN, F. *et al.* The potential mechanistic insights and future implications for the effect of prebiotics on poultry performance, gut microbiome, and intestinal morphology. **Poultry Science**. v. 10, 2021.

YANG, D.; JACOBSON, A.; MEERSCHAERT, K.A. *et al.* Nociceptor neurons direct goblet cells via a CGRP-RAMP1 axis to drive mucus production and gut barrier protection. **Cell**. v. 185, p. 4190-205, 2022.

YU, Z.; JOOSSENS, M.; VAN DEN ABEELE, A.M. *et al.* Isolation, characterization and antibiotic resistance of *Proteus mirabilis* from Belgian broiler carcasses at retail and human stool. **Food Microbiology**. v. 96, p. 103, 2021.

ZENG, J.; YANG, K.; NIE, H. *et al.* The mechanism of intestinal microbiota regulating immunity and inflammation in ischemic stroke and the role of natural botanical active ingredients in regulating intestinal microbiota: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 157, p. 907-23, 2023.

ZHANG, W.; LYU, M.; BESSMAN, N.J. *et al.* Gut-innervating nociceptors regulate the intestinal microbiota to promote tissue protection. **Cell**. v. 185, p. 4170-89, 2022.

ZHANG, P.; ZHANG, X.; HUANG, Y. *et al.* Atorvastatin alleviates microglia-mediated neuroinflammation via modulating the microbial composition and the intestinal barrier function in ischemic stroke mice. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 162, p.104-17, 2021.

ZHU, X.Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y. *et al.* 16S rRNA-based analysis of

microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 124-47, 2002.

ZOETENDAL, E.G.; COLLIER, C.T.; KOIKE, S. *et al.* Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. **The Journal of Nutrition**. v. 134, p. 465-72, 2004.

ANEXO I – COMPROVANTE DO CEUA



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

Universidade do Estado de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise Metagenômica da Microbiota Intestinal de Galinhas Poedeiras Tratadas na Ração com Fitobióticos", protocolada sob o CEUA nº 9641230522 (ID 001575), sob a responsabilidade de **Lenita de Cássia Moura Stefani** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 27/05/2022.

We certify that the proposal "Metagenomic Analysis of the Intestinal Microbiota of Laying Hens Feed Treated with Phytobiotics", utilizing 140 Birds (140 females), protocol number CEUA 9641230522 (ID 001575), under the responsibility of **Lenita de Cássia Moura Stefani** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 05/27/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 06/2022 a 09/2022 – Área: Zootecnia

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Aves

sexo: Fêmeas

idade: 15 a 42
semanas

N: 140

Linhagem: Hy-Line Brown

Peso: 1200 a 2500 kg

Lages, 11 de junho de 2023

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina



ANEXO II – GÊNEROS ENCONTRADOS

[illegible]