

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/04/2025

At the author's request, the full text of this thesis/ dissertation will not be available online until April 13, 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO À BASE DE BACILOS
NO DESEMPENHO, INTEGRIDADE INTESTINAL E BEM-ESTAR DE FRANGOS
DE CORTE**

ANDRESSA SILVA JACINTO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia da FMVZ –
UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre

BOTUCATU – SP

Abril de 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO A BASE DE BACILOS
NO DESEMPENHO, INTEGRIDADE INTESTINAL E BEM-ESTAR DE FRANGOS
DE CORTE**

ANDRESSA SILVA JACINTO
Médica Veterinária

Orientadora: Profa. Assoc. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia da FMVZ –
UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre

BOTUCATU – SP

Abril de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jacinto, Andressa Silva.

Influência da suplementação com probiótico à base de bacilos no desempenho, integridade intestinal e bem-estar de frangos de corte / Andressa Silva Jacinto. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Capes: 50405004

1. Frango de corte. 2. Probióticos. 3. Intestinos.
4. Bacillus subtilis. 5. Serotonina.

Palavras-chave: Aditivo melhorador de desempenho; Bacillus amyloliquefaciens; Bacillus licheniformis; Bacillus subtilis; Serotonina.

BIOGRAFIA

Andressa Silva Jacinto, nasceu em Pires do Rio, estado de Goiás, em 25 de junho de 1996. Filha de Carlos Jacinto e Lillian Cristina da Silva Jacinto. No ano de 2014, ingressou no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, *campus* Urutaí, obtendo o título de Bacharel em Medicina Veterinária. Em 2020, ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP – Botucatu/SP), na Área de Produção Animal, com foco em Avicultura.

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Lillian Cristina da Silva Jacinto e Carlos Jacinto, por acreditarem no meu potencial, me incentivarem e por fornecerem o suporte necessário. Toda essa etapa só foi possível graças ao apoio deles.

As minhas irmãs Caroline Cristina Silva Jacinto e Geovana Silva Jacinto de Oliveira e meus cunhados Pedro Ramires Henriques e Warlei Mendes de Oliveira, que estiveram sempre ao meu lado e são um apoio pra mim.

A minha avó Maria Vicentina Gonçalves da Silva por todas as orações e ensinamentos.

Aos meus amigos Janeley Oliveira, Pável Costa, Rosiene Martins, Luis de Souza, Ester Martins, Samuel Martins, Magda Henriques, Silvio Henriques e Janaina Correia que mesmo estando a quilômetros de distância, me apoiaram incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pelo dom da vida e pelo fortalecimento do meu corpo e espírito. Ele é o maior responsável pelo meu sucesso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

A empresa Chr. Hansen, em especial ao senhor Alberto Yocytaca Inoue, pelo apoio para realização deste projeto.

A minha orientadora Profa. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz, por acreditar no meu potencial, pela orientação, cuidado, paciência e inspiração. Obrigada por toda contribuição para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor José Roberto Ferreira Alves Júnior, que me acompanha desde o início da minha formação e é um dos meus maiores incentivadores. Obrigada por ver em mim um potencial que nem eu mesma conseguia ver.

A professora Elisane Lenita Milbradt, por toda contribuição no desenvolvimento do projeto e realização das análises laboratoriais desenvolvidas neste trabalho.

A todos os meus colegas de pós-graduação, amigos, alunos de iniciação científica, estagiários e funcionários que passaram pelo setor de avicultura, em especial, Thaís Alves, Gustavo Henrique Chaves, Caio Ouros, Marconi Italo, Nathalie Vásquez, Marcos Antonio Nascimento, Ana Beatriz Oliveira, Felipe Takis, Ingrid Althaman, Francine Mota, Natália Schnetzler, Gabriel Costa, Ana Júlia Santin, Carolina Zucatlle, Pedro Bettarello, Gustavo Brito, Gilson Campos e Walter Jorge, que auxiliaram para que o meu projeto fosse desenvolvido e concretizado com sucesso.

A supervisão das Fazendas de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) e a Fábrica de Ração da FMVZ, pelo apoio durante toda a realização do experimento.

Aos professores do programa de pós-graduação, e todos os funcionários do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, por toda ajuda e colaboração em todos os momentos.

Aos membros da Comissão Examinadora, por seu tempo e contribuição ao meu estudo.

“...nem tudo será como antes, algumas coisas poderão deixar de ser como eram.”

(Mario Sergio Cortella)

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO A BASE DE BACILOS NO DESEMPENHO, SAÚDE INTESTINAL E BEM-ESTAR DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO - Objetivou-se com este estudo avaliar a utilização de diferentes probióticos a base de bacilos como alternativa ao uso de antibióticos melhoradores de desempenho, bem como os efeitos na produtividade, integridade intestinal e bem-estar de frangos de corte. Para isso foram utilizadas 2120 aves, machos, linhagem Ross 308 AP, com um dia de idade. Os frangos foram alojados em aviário experimental dividido em 40 boxes, sendo alojados 53 animais por boxe. Os tratamentos experimentais consistiram em: Controle positivo (CP) dieta com clorihidroxiquinolina como aditivo melhorador de desempenho; Probiótico A (ProbA) dieta com uma mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*; Probiótico B (ProbB) dieta com adição de *Bacillus amyloliquefaciens*; e Controle negativo dieta sem nenhum aditivo. Foram avaliadas as características produtivas (desempenho, rendimento de carcaça e partes, eficiência econômica alimentar, e fator de eficiência produtiva); as características locomotoras, comportamentais e indicadores de bem-estar (gait score, pododermatite, latency to lie, miopatia dorsal cranial, testes de apanha e aproximação, produção e expressão gênica de serotonina); características intestinais (altura de vilosidades e profundidade de criptas, largura de vilosidades e relação vilo:cripta) e qualidade de cama. As aves suplementadas com probióticos (ProbA e Prob B) apresentaram melhora significativa no ganho de peso, conversão alimentar, eficiência produtiva e eficiência econômica em comparação com os tratamentos CP e CN. As aves suplementadas com probiótico, em especial o ProbA, apresentaram melhoras em relação as características de bem-estar, estas ficaram mais calmas e menos reativas na presença de estímulos estressores. As aves que receberam suplementação probiótica também apresentaram índices mais altos de serotonina circulante no sangue e maior expressão dos genes 5HTT, SLC6A4 e TPH1. A utilização de probióticos foi capaz de manter a integridade da mucosa intestinal, demonstrado pela profundidade reduzida das criptas intestinais e vilos mais espessos. Conclui-se que a suplementação de uma mistura de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* mostrou-se eficiente como alternativa aos aditivos melhoradores de desempenho, além de auxiliar na manutenção da integridade intestinal e bem-estar das aves.

Palavras-Chave: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, aditivo melhorador de desempenho, serotonina.

EFFECTS OF BACILLUS-BASED PROBIOTIC SUPPLEMENTATION ON PERFORMANCE, INTESTINAL INTEGRITY AND WELFARE OF BROILERS

ABSTRACT- The aim of this study was to evaluate the use of different bacilli-based probiotics as an alternative to the use of antibiotic growth promoters (AMD) and their effects on productivity, intestinal integrity and welfare of broilers. For this, 2,120 one-day-old male birds, Ross 308 AP strain were used. These broilers were housed in an experimental aviary, split into 40 boxes, with 53 animals per box. The experimental treatments consisted of: Positive control (PC) diet with chlorihydroxyquinoline as a growth promoter additive; Probiotic A (ProbA) diet with a mixture of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*; Probiotic B (ProbB) diet with added *Bacillus amyloliquefaciens*; and Negative control diet without any additives. Production characteristics (performance, carcass and part yield, feed economic efficiency, and production efficiency factor); locomotor and behavioral characteristics and welfare indicators (gait score, pododermatitis, latency to lie, cranial dorsal myopathy, catch and approach tests, serotonin production and gene expression); intestinal characteristics (villus height and crypt depth, villus width and villus:crypt ratio) and litter quality were evaluated. The birds supplemented with probiotic, especially ProbA, showed improvements in relation to the welfare characteristics, they were calmer and less reactive in the presence of stressful stimuli. The birds that received probiotic supplementation also showed higher levels of circulating serotonin in the blood and greater expression of the genes 5HTT, SLC6A4 and TPH1. The use of probiotics was able to maintain the integrity of the intestinal mucosa, demonstrated by the reduced depth of the intestinal crypts and thicker villi. We conclude that the supplementation of a mixture of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* proved to be efficient as an alternative to performance enhancing additives, besides helping to maintain the intestinal integrity and welfare of the birds.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, performance enhancer additive, serotonin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Gráfico 1 - Níveis de serotonina circulante no sangue de frangos de corte	46
Gráfico 2 – Expressão relativa do gene TPH1.....	47
Gráfico 3 – Expressão relativa do gene SLC6A4.....	48
Gráfico 4 – Expressão relativa do gene 5HTT	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais (Inicial, crescimento e final). ..	34
Tabela 2 - Desempenho de frangos de corte, período 1 a 42 dias, suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.	35
Tabela 3 - Rendimento de carcaça e partes da carcaça de frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.....	36
Tabela 4 - Frequência de <i>gait score</i> em frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos, aos 28, 35 e 42 dias.....	37
Tabela 5 - Frequência de pododermatite em frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos, aos 35 e 42 dias.....	38
Tabela 7 – Frequências do teste de aproximação e latency to lie de frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.....	39
Tabela 8 – Frequência do teste de apanha para frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.	40
Tabela 9 - Frequência de Miopatia Dorsal Cranial em frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.	41
Tabela 10 - Altura de vilosidades e profundidade de criptas de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.	42
Tabela 11 - Largura de vilosidade de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.....	43
Tabela 12 - Relação vilo:cripta de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte suplementados ou não com probióticos a base de bacilos.....	44
Tabela 13 - Qualidade da cama antes do início do experimento e após 42 dias de condução do estudo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AMD	Aditivos melhoradores de desempenho
CA	Conversão alimentar
CEUA.....	Comissão de ética no uso de animais
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CV	Coeficiente de variação
EEA.....	Eficiência econômica alimentar
FAO.....	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FAWC	Farm Animal Welfare Council (Conselho de bem-estar de animais de produção)
FEP.....	Fator de eficiência produtiva
FMVZ.....	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GP.....	Ganho de peso
5HTT	Serotonin transporter (transportador de serotonina)
MDC.....	Miopatia dorsal cranial
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
ProbA	Probiótico A
ProbB	Probiótico B
SLC6A4.	Solute carrier family 6 member 4 (família de transportadores de soluto 6 membro 4)
SNE	Sistema nervoso entérico
TGI.....	Trato gastrointestinal
TPH1.	Tryptophan hydroxylase 1 (triptofano hidroxilase 1)
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VB	Viabilidade
VI/CR	Relação vilo:cripta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Antibióticos melhoradores de desempenho.....	3
1.2 Probióticos.....	5
1.3 Saúde intestinal e Probióticos.....	7
1.4 Avaliações de bem-estar.....	10
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2.....	1
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
Aves, Instalações e Dieta	7
Delineamento Experimental.....	8
Avaliações de Bem-estar, Integridade intestinal e Comportamento	9
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO.....	18
CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS	25
IMPLICAÇÕES	50

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A avicultura brasileira possui lugar destaque na economia global, ocupando a posição de terceiro maior produtor de carne de frango e o maior exportador (ABPA, 2021). Isso devido aos esforços de todos os elos do setor produtivo em garantir um produto de qualidade, que atenda as exigências do consumidor, preocupando-se com a segurança alimentar e com bem-estar das aves (Schmidt & da Silva, 2018).

Entretanto o setor avícola se encontra diante de uma problemática relacionada a utilização de antibióticos melhoradores de desempenho e segurança alimentar. Existe uma forte preocupação por parte dos consumidores e a necessidade de adequação as barreiras não-tarifárias impostas por países importadores, que visam a retirada destes compostos da produção animal (Medeiros, et al. 2001).

Além disso, este tema demanda atenção pois acredita-se que tais drogas colaboram para o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes, por outro lado a retirada dos antibióticos melhoradores de desempenho acarretará em prejuízos ao setor por redução do desempenho técnico e aumento de problemas gastrointestinais (Langhout, 2005). Uma vez que estas aves ao nascerem possuem uma microbiota intestinal pouco desenvolvida devido à ausência de contato com uma microbiota natural, afim de garantir a inocuidade destas até a chegada nas granjas de criação (Silva, 2000).

Somado a isso, há uma crescente pressão mundial por práticas mais sustentáveis nos sistemas produtivos, entre elas encontra-se o bem-estar animal. O animal cada vez menos é visto como um objeto ou uma propriedade, mas sim como um ser senciente que sente dor e emoções e está sujeito ao sofrimento (Duncan, 2006; Cornish et al., 2016).

Diante deste cenário, as pesquisas no setor avícola passaram a ter um novo enfoque, buscando desenvolver alternativas que auxiliem na melhora do desempenho animal, mas que sejam inócuos para o animal e para o homem e que atendam às exigências dos protocolos de bem-estar animal (Dibner & Richards, 2005).

assim, os menores níveis destes fatores nas camas provenientes do tratamento ProbA, resultou em menor liberação do composto prejudicial (amônia). Resultados semelhantes foram descritos por Pezzuolo *et al.* (2019), desmonstrando que a aplicação de probióticos na cama foi capaz de reduzir em até 36% a emissão de amônia em aviário comercial.

Além disso, a redução da excreção de nitrogênio (N) é um fator importante, uma vez que este participa diretamente dos processos químicos para formação da amônia. Neste estudo observou-se menor porcentagem de N para as aves suplementadas com probióticos, quando comparadas com os demais tratamentos. Alguns autores (Naseem & King, 2018; Silva, 2017) demonstraram que a utilização de probióticos é capaz de auxiliar através do mecanismo de exclusão competitiva de determinadas bactérias, reduzir os níveis de nitrogênio e por consequência reduzir os níveis de amônia (NH₃). A redução da excreção de nitrogênio pode ser justificada também pela função que os probióticos exercem a nível intestinal, favorecendo maior digestão de nutrientes com melhor aproveitamento da proteína e, conseqüentemente, maior incorporação de nitrogênio (Rizaldi *et al.*, 2020; Hendalia Ella, Manin Fahmida, Yusrizal, 2012).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que, a suplementação de probióticos a base de bacilos, como alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho para frangos de corte, é uma ferramenta eficiente, uma vez que estes produtos favorecem a manutenção da integridade intestinal e desempenho produtivo. Além de reduzir a incidência de pododermatite, e corroborar para a manutenção de níveis mais altos de serotonina livre e bem-estar. As correlações encontradas entre a utilização de cepas probióticas, especialmente a mistura contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, e os indicadores de bem-estar para frangos de corte reforçam a ideia da ligação do sistema nervoso central e entérico e conseqüente interferência no bem-estar.

REFERÊNCIAS

Ahmat, M., J. Cheng, Z. Abbas, Q. Cheng, Z. Fan, B. Ahmad, M. Hou, G. Osman, H. Guo, J. Wang, and R. Zhang. 2021. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* lfb112 on growth performance, carcass traits, immune, and serum biochemical response in broiler chickens. *Antibiotics* 10:1–17.

Almeida Paz, I. C. L., R. G. Garcia, R. Bernardi, I. A. Nääs, F. R. Caldara, L. W. Freitas, L. O. Seno, V. M. O. S. Ferreira, D. F. Pereira, and F. Cavichiolo. 2010. Selecting appropriate bedding to reduce locomotion problems in broilers. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 12:189–195.

Almeida Paz, I. C. de L., I. C. de Lima Almeida, L. T. de La Vega, E. L. Milbradt, M. R. Borges, G. H. C. Chaves, C. C. dos Ouros, M. I. Lourenço da Silva, F. R. Caldara, and R. L. Andreatti Filho. 2019. Productivity and Well-Being of Broiler Chickens Supplemented With Probiotic. *J. Appl. Poult. Res.* 28:930–942.

Alves, M. C. F., I. C. L. Almeida Paz, I. A. Nääs, R. G. Garcia, F. R. Caldara, G. A. A. Baldo, G. R. Nascimento, M. S. Amadori, G. A. Felix, E. A. Garcia, and A. R. Molino. 2016. Equilibrium condition during locomotion and gait in broiler chickens. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 18:419–426.

Aluja, A.; Garcia, L.F.; Blanch, A.; De Lorenzo, D.; Fibla, J. 2009. Impulsive-disinhibited personality and serotonin transporter gene polymorphisms: association study in an inmate's sample. *Journal of Psychiatric Research*, v. 43, p.906-914.

Arreola, R.; Becerril-Villanueva, E.; Cruz-Fuentes, C.; Velasco-Velázquez, M.A.; Garcés-Alvarez, M.A.; Hurtado, A. G.; Quintero, F. S.; Pavón, L. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *Journal of immunology research*, v. 2015, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/354957>.

Behmer, A. O., Tolosa, E. M. C. & Freitas Neto, A. G. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Eduspe, 239p.

- Bethea, C. L.; Streicher, J.M.; Coleman, K.; Pau, F. K.; Moessner, R.; Cameron, J. L. 2004. Anxious behavior and fenfluramine-induced prolactin secretion in young rhesus macaques with different alleles of the serotonin reuptake transporter polymorphism (5HTTLPR). *Behavior Genetics*, v. 34, p. 295-307.
- Broom, D. M. 2006. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Applied Animal Behaviour Science*, 97:73-83.
- Cerdó, T., A. Ruíz, A. Suárez, and C. Campoy. 2017. Probiotic, prebiotic, and brain development. *Nutrients* 9:1–19.
- Chapman, M. E., R. L. Taylor, and R. F. Wideman. 2008. Analysis of plasma serotonin levels and hemodynamic responses following chronic serotonin infusion in broilers challenged with bacterial lipopolysaccharide and microparticles. *Poult. Sci.* 87:116–124 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2007-00160>.
- Carvalho, T. M. R de; Moura, D. J de; Souza, Z. M de; Souza, G. S de; Bueno, L. G de F.. Qualidade da cama e do ar em diferentes condições de alojamento de frangos de corte. *Pesq. Agropec. Bras.* Vol. 46 no.4 Brasília , 2011.
- Chakraborty, S.; Chakraborty, D.; Mukherjee, O.; Jain, S.; Ramakrishnam, U.; Sinha, A. 2010. Genetic polymorphism in the serotonin transporter promoter region and ecological success in macaques. *Behavior genetics*, v.40, p.672-679.
- Chenxuan, H.; Qiaoxian, Y.; Yifan, C.; Dehe, W.; Rongyan, Z.; Guoxian, Z.; Hul, C., 2021. Effects of in ovo injection of serotonin on behavior and hypothalamic genes expression in post hatch-chicks. *Applied Animal Behavior Science*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2020.10517>.
- Chiozzini, T. F., and P. Soster. 2016. Efeito do estímulo multissensorial em frangos de corte sobre o teste de apanha e aproximação. VII Brazilian Congr. Biometeorol. Ambiente, Behav. Anim. Welf. “Environmental Responsib. Innov.:1–4 Available at http://www.sbbiomet.org.br/trabalhoscongresso/efeito_do_estimulo_multissensorial_em_fra

ngos_sobre_o_teste_de_apanha_e_aproximacao_932131499113066.pdf.

Daí Prá, M. A., Roll, V. F. B. Cama de frangos de corte Materiais reutilização e destino. Seminario Internacional de Manejo y Sistemas Operativos en Pollo de Engorde - AMEVEA, Bogotá D.C. 17-19, 2014.

Dawkins, M. S., C. A. Donnelly, and T. A. Jones. 2004. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature* 427:342–344.

Donato, T. C., A. A. S. Baptista, K. C. O. D. Garcia, B. D. Smaniotto, A. S. Okamoto, J. L. Sequeira, and R. L. A. Filho. 2015. Effects of 5-hydroxytryptophan and m-hydroxybenzylhydrazine associated to *Lactobacillus* spp. on the humoral response of broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. *Poult. Sci.* 94:2081–2087 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev206>.

Dyce, K.M.; Sack, W.O. & Wensing, C.J. 1996. Tratado de Anatomia Veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, II +171 p.

Fernandes, B. C. da S., M. R. F. B. Martins, A. A. Mendes, I. C. de L. Almeida Paz, C. M. Komiyama, E. L. Milbradt, and B. B. Martins. 2012. Locomotion problems of broiler chickens and its relationship with the gait score. *Rev. Bras. Zootec.* 41:1951–1955.

Flemming, J. S., and R. J. S. Freitas. 2005. Avaliação do Efeito de Prebióticos (Mos), Probióticos (*Bacillus Licheniformis* e *Bacillus Subtilis*) e Promotor de Crescimento na Alimentação de Frangos de Corte. *Arch. Vet. Sci.* 10:41–4

Fukayama, E. H., A. G. Bertechini, A. Geraldo, R. K. Kato, and L. D. S. Murgas. 2005. Oregan extract as an additive in the broiler diet. *Rev. Bras. Zootec.* 34:2316–2326.

Gharib-Naseri, K., J. C. de Paula Dorigam, K. Doranalli, S. Kheravii, R. A. Swick, M. Choct, and S. B. Wu. 2020. Modulations of genes related to gut integrity, apoptosis, and immunity underlie the beneficial effects of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 in broilers fed diets with different protein levels in a necrotic enteritis challenge model. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11:1–13.

Gong, L., B. Wang, X. Mei, H. Xu, Y. Qin, W. Li, and Y. Zhou. 2018. Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. *Anim. Sci. J.* 89:1561–1571.

Guan, J.; Chan, M.; Grenier, C.; Wilkie, D. C.; Brooks, B. W.; Spencer, J. L. 2009. Survival of avian influenza and Newcastle diseases viruses in compost and at ambient temperatures based on virus isolation and real-time reverse transcriptase PCR. *Avian Dis.*, Jacksonville, v.53, n1, p. 26-33.

Han, A. Y., M. H. Zhang, X. L. Zuo, S. S. Zheng, C. F. Zhao, J. H. Feng, and C. Cheng. 2010. Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broiler chickens. *Poult. Sci.* 89:2063–2070 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2010-00715>.

Hendalia Ella, manin Fahmida, Yusrizal, gong M. N. 2012. Aplikasi Probiotik Untuk Meningkatkan Efisiensi Penggunaan Protein Dan Menurunkan Emisi Amonia Pada Ayam Broiler. *Agrinak* 2:29–35.

Hernandes, R., and J. O. Cazetta. 2001. Método simples e acessível para determinar amônia liberada pela cama aviária. *Rev. Bras. Zootec.* 30:824–829.

Hernandes, R., J. O. Cazetta, and V. M. B. De Moraes. 2002. Frações nitrogenadas, glicídicas e amônia liberada pela cama de frangos de corte em diferentes densidades e tempos de confinamento. *Rev. Bras. Zootec.* 31:1795–1802.

Hideaki, A.; Hiro-aki, T.; Satoko, Y.; Akihiro, N; Kenji, N.; Keijiro, N.; Shin'ichi, I.; Miho, I. M.. 2013. Characterization of the intronic VNTR polymorphisms found in a paralog of chicken serotonin transporter gene. *Animal Science Journal*, v. 84, p.281-288. <http://dx.doi.org/10.1111/asj.12011>.

Hsiang-tang, C., and C. L. Jahau. 2003. Eco-Innovative Examples for 40 TRIZ Inventive Principles. *Triz-Journal*:1–16 Available at <http://www.triz-journal.com/archives/2003/06/a/01.pdf%0A5>.

Ibrahim, R. R., F. Khalil, A. S. Mostafa, and H. H. Emeash. 2018. Efficacy of probiotic in improving welfare and mitigating overcrowding stress in broilers. *J. Adv. Vet. Res.* 8:73– 78.

Jiang, S.; Yan, J. Y. Hu; Mohamed, A.; Cheng, H. W. 2021. *Bacillus subtilis*-based probiotic improves skeletal health and immunity in broiler chickens exposed to heat stress. *Animals* 11:1–21. Available at <https://doi.org/10.3390/ani11061494>.

Jonsson, E. G.; Goldman, D.; Spurlock, G.; Gustavsson, J. P.; Nielsen, D.A.; Linnoila, M.; Owen, M. J.; Sedvall, G. C. Tryptophan hydroxylase and catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms: relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 247, n. 6, p.297, 1997. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02922258>.

Kent, L.; Doerry, U.; Hardy, E.; Parmar, R.; Gingell, K.; Hawi, Z.; Kirley, A.; Lowe, N.; Fitzgerald, M.; Gill, M.; Craddock, N. 2002. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Molecular Psychiatry*, v. 7, p. 908-912.

Kim, Y., J. Y. Cho, J. H. Kuk, J. H. Moon, J. Il Cho, Y. C. Kim, and K. H. Park. 2004. Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Fermented Soybean, Chungkook-Jang. *Curr. Microbiol.* 48:312–317.

Kuzelova, H.; Ptacek, R.; Macek, M. 2010. The serotonin transporter gene (5-HTT) variant and psychiatric disorders: review of current literature. *Neuroendocrinology Letters*, v.31, p.4-10.

Liu, N., X. Deng, C. Liang, and H. Cai. 2018. Effect of broccoli residues fermented with probiotics on the growth performance and health status of broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 20:625–632.

Livak, K. J.; Schmittegen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Luczynski, P., K. A. M. V. Neufeld, C. S. Oriach, G. Clarke, T. G. Dinan, and J. F. Cryan. 2016. Growing up in a bubble: Using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19:1–17.

Medeiros, P. T., M. T. S. Padilha, J. C. F. Padilha, F. Espíndola, and R. Maggioni. 2011. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. *Biotemas* 22:157–163.

Midilli, M., M. Alp, N. Kocabağlı, Ö. H. Muğlali, N. Turan, H. Yilmaz, and S. Çakir. 2008. Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. *South African J. Anim. Sci.* 38:21–27.

Midilli, M., and Ş. D. Tuncer. 2001. The Effects of Enzyme and Probiotic Supplementation to Diets on Broiler Performance. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 25:895–903.

Moore Jr., P.A.; Daniel. T.C.; Edwards, D.R. Reducing phosphorus runoff and inhibiting ammonia loss from poultry manure with aluminum sulfate. *Journal of Environmental Quality*, v.29, n.1, p.29-37, 2000.

Mohammed, A. A., R. S. Zaki, E. A. Negm, M. A. Mahmoud, and H. W. Cheng. 2021. Effects of dietary supplementation of a probiotic (*Bacillus subtilis*) on bone mass and meat quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 100:100906.

Nääs, I. A., I. C. L. A. Paz, M. S. Baracho, A. G. Menezes, L. G. F. Bueno, I. C. L. Almeida, and D. J. Moura. 2009. Impact of lameness on broiler well-being. *J. Appl. Poult. Res.* 18:432–439.

Naseem, S., and A. J. King. 2018. Ammonia production in poultry houses can affect health of humans, birds, and the environment—techniques for its reduction during poultry production. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25:15269–15293.

Nogueira, B.L. 2015. Probióticos para tratamento de doenças neurológicas; uma revisão. [Monografia] Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

Pelícia, K., A. Mendes, E. Saldanha, C. Pizzolante, S. Takahashi, R. Garcia, J. Moreira, I. Paz, R. Quinteiro, and C. Komiyama. 2004. Probiotic and prebiotic utilization in diets for freerange broiler chickens. *Rev. Bras. Ciência Avícola* 6:99–104.

Pezzuolo, A., C. Sartori, E. Vigato, and S. Guercini. 2019. Effect of litter treatment with probiotic bacteria on ammonia reduction in commercial broiler farm. *Eng. Rural Dev.* 18:1631–1635.

Rizaldi, A., H. Hakim, E. A. Rimbawanto, and B. Hartoyo. 2020. Penggunaan Acidifier sebagai Feed Additive dalam Pakan yang Mengandung Probiotik terhadap N-NH₃ dan Kadar Air Feses Ayam Broiler The Use of Acidifier as Food Additive in Feed Containing Probiotic Towards N-NH₃ And Water Content of Broiler Chicken Feces. 2:98–105.

Roll, V. F. B.; Lopes, L. L.; Gonçalves, F. M.; Anciuti, M.; Leite, F. L.; Corrêa, E. K.; Xavier, E. G. 2008. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de corte. *Ciênc. Rur.*, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2650-2653.

Rostagno, H. S. *et al.* 2017. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements.

Santana, E. S., F. R. Mendes, A. C. D. S. Barnabé, F. H. De Oliveira, and M. A. Andrade. 2011. Uso De Produtos Alternativos Aos Antimicrobianos Na Avicultura. *ENCICLOPÉDIA Biosf. Cent. Científico Conhecer* 7:985–1009.

Sahu, M. K., N. S. Swarnakumar, K. Sivakumar, T. Thangaradjou, and L. Kannan. 2008. Probiotics in aquaculture: Importance and future perspectives. *Indian J. Microbiol.* 48:299–308.

Santoso U, Ohtani S, Tanaka K, Sakaida M. 1999. Dried *Bacillus subtilis* culture reduced

ammonia gas release in poultry house. *Asian Austr J Anim Sci* 12:806–809

Santisteban, M. M., S. Kim, C. J. Pepine, and M. K. Raizada. 2016. Brain-gut-bone marrow axis: Implications for hypertension and related therapeutics. *Circ. Res.* 118:1327–1336.

Silva, I. G. O. Vellano I.H.B.; Moraes A.C.; Lee. I.M.; Alvarenga B.; Milbradt E.L.; Hataka A.; Okamoto A.S.; Andreatti Filho R. L. Product Inoculated In Ovo on Broiler Chickens Challenged with Salmonella Heidelberg. *Brazilian Journal of Poultry Science*, [s. l.], v. 19, 2017.

Shang, Y., S. Kumar, B. Oakley, and W. K. Kim. 2018. Chicken gut microbiota: Importance and detection technology. *Front. Vet. Sci.* 5.

Wang, B., Y. Zhou, L. Tang, Z. Zeng, L. Gong, Y. Wu, and W. F. Li. 2021b. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* Instead of Antibiotics on Growth Performance, Intestinal Health, and Intestinal Microbiota of Broilers. *Front. Vet. Sci.* 8:1–12.

Wang, W. C., F. F. Yan, J. Y. Hu, O. A. Amen, and H. W. Cheng. 2018. Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 96:1654–1666.

Wang, Y., X. Lv, X. Li, J. Zhao, K. Zhang, X. Hao, K. Liu, and H. Liu. 2021a. Protective Effect of *Lactobacillus plantarum* P8 on Growth Performance, Intestinal Health, and Microbiota in *Eimeria*-Infected Broilers. *Front. Microbiol.* 12:1–15.

WELFARE QUALITY ®. Welfare Quality® assessment protocol for poultry (broilers, laying hens) Welfare Quality® Consortium, Lelystad, Netherlands, 2009.

Zimmermann, F. C., L. C. B. Fallavena, C. T. P. Salle, H. L. S. Moraes, R. A. Soncini, M. H. Barreta, and V. P. Nascimento. 2012. Downgrading of heavy broiler chicken carcasses due to myodegeneration of the anterior latissimus dorsi: Pathologic and epidemiologic studies. *Avian Dis.* 56:418–421.

Zaiss, M. M., R. M. Jones, G. Schett, and R. Pacifici. 2019. The gut-bone axis: How bacterial

metabolites bridge the distance. *J. Clin. Invest.* 129:3018–3028.