UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL EM AVES COMERCIAIS: EXPLORANDO POTENCIAL PROBIÓTICO, GENES DE MULTIRESISTÊNCIA E TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES

Julia Memrava Cabrera
Zootecnista

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL EM AVES COMERCIAIS: EXPLORANDO POTENCIAL PROBIÓTICO, GENES DE MULTIRESISTÊNCIA E TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES

Julia Memrava Cabrera
Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2026

C117a

Cabrera, Julia Memrava
Análise metagenômica da microbiota intestinal em aves comerciais : explorando potencial probiótico, genes de multiresistência e transferência horizontal de genes / Julia Memrava Cabrera. -- Jaboticabal, 2026
107 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Alessandro de Mello Varani

1. Bacteriocinas. 2. Genomas montados a partir de metagenomas. 3. Probióticos. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Saúde avícola. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Julia Memrava Cabrera, nascida em São Paulo – SP, em 26 de julho de 1991, é bacharel em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/Unesp), concluído em 2019. Após a graduação, foi bolsista de Treinamento Técnico nível 3 (TT-3) pela FAPESP (Processo nº 2019/23298-1), atuando no Grupo de Pesquisa em Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV. Obteve o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária pela mesma instituição em 2022, com a dissertação intitulada "Análise histológica de aves comerciais (*Gallus gallus domesticus*) desafiadas por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo deleção dos genes *ttr*A e *pdu*A". Atualmente, é doutoranda no Programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/Unesp, tendo sido inicialmente contemplada com bolsa/auxílio CAPES (Código de Financiamento nº 88887.817742/2023-00) e, posteriormente, com bolsa FAPESP (Processo nº 2023/10686-9). Possui experiência nas áreas de zootecnia e microbiologia aplicada, com ênfase em bactérias enteropatogênicas, especialmente *Salmonella* spp., além de atuação em bioinformática, com foco em metagenômica e genômica comparativa de procariontes.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosana Memrava, por ser presença constante, apoio incondicional e exemplo de força, sensibilidade e generosidade ao longo de toda a minha vida. Obrigada por acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei, por respeitar minhas escolhas e por tornar possível cada passo dessa trajetória com amor, dedicação e cuidado. Muito do que sou foi construído a partir dos valores, do acolhimento e da segurança que sempre encontrei em você. Sou profundamente grata por ter, além de uma mãe extraordinária, uma companheira para a vida inteira. As lembranças que construímos juntas seguem sendo algumas das partes mais felizes e preciosas da minha história.

Ao meu namorado, Prof. Dr. Daniel Farias Marinho do Monte, por caminhar ao meu lado com tanta generosidade e incentivo constante. Ter alguém com quem compartilhar não apenas a vida, mas também conversas, ideias, aprendizados e sonhos, tornou essa trajetória muito mais especial. Sua presença trouxe leveza aos momentos difíceis, entusiasmo às conquistas e um senso de parceria que ultrapassa qualquer definição simples. Sou profundamente grata por todo apoio, carinho e confiança ao longo desse caminho.

Ao Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani, por ter me recebido em seu laboratório e pela confiança depositada em meu trabalho desde o início desta trajetória. Agradeço pelas oportunidades de aprendizado e por compartilhar seu conhecimento sempre com muita generosidade. Sua dedicação à pesquisa e à formação de alunos teve papel fundamental no meu desenvolvimento como pesquisadora e profissional.

Aos meus caros colegas do Grupo de Pesquisa em Genômica e Bioinformática de Plantas e Microrganismos, pela convivência diária, pelas trocas de conhecimento, pelo apoio nos momentos desafiadores e por todos os momentos de descontração compartilhados ao longo dessa trajetória. A presença de vocês tornou essa caminhada muito mais leve, acolhedora e significativa.

Ao Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, pelo suporte institucional, pela infraestrutura disponibilizada e pelo ambiente acolhedor e colaborativo, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, pela formação científica proporcionada, pelas disciplinas enriquecedoras e pelas oportunidades que contribuíram de maneira significativa para meu crescimento acadêmico e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado inicial (Código de Financiamento 88887.817742/2023-00), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado a partir do segundo ano de curso (Processo nº 2023/10686-9, vinculado ao Projeto Temático nº 2018/25511-1). O apoio financeiro e estrutural dessas instituições foi essencial para a realização deste trabalho.

E, por último, mas não menos importante, aos membros da banca examinadora, que contribuíram substancialmente para melhoria desta Tese.

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

SUMÁRIO

Página

RESUMO iii
ABSTRACT v
LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE TABELAS ix
LISTA DE ABREVIAÇÕES x
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais 1
1. Introdução 1
2. Revisão de literatura 4
2.1. Introdução ao setor avícola e relevância da microbiota 4
2.1.1. Mercado avícola global 4
2.1.2. Sistemas de criação e linhagens comerciais 6
2.2. Fatores que influenciam a microbiota intestinal em aves 7
2.2.1. Alimentação e nutrição 7
2.2.2. Trato gastrointestinal (TGI) de aves 11
2.3. Microbiota e microbioma em aves comerciais 15
2.3.1. Conceitos básicos: microbiota vs. microbioma 15
2.3.2. Bactérias predominantes no trato gastrointestinal aviário 19
2.4. Metagenômica aplicada à avicultura 22
2.4.1. Repositórios públicos e metadados 22
2.4.2. Genes anotados e vias metabólicas 25
2.4.3. Plasmídeos e elementos genéticos móveis 28
2.5. Resistência antimicrobiana e regulamentação do uso de antimicrobianos ... 31
2.5.1. Genes de resistência e virulência 31
2.5.2. Legislação sobre uso de antibióticos 35
2.6. Aplicações biotecnológicas e estratégias alternativas 38
2.6.1. Sistema CRISPR-Cas em bactérias intestinais 38
2.6.2. Potencial probiótico e alternativas a antibióticos 40
3. Hipótese e objetivos 44
3.1. Hipótese 44
3.2. Objetivo geral 44
3.3. Objetivos específicos 44

CAPÍTULO 2 – An integrated genome catalogue of the chicken gut microbiome links acquired antimicrobial resistance, mobility and probiotic potential 46
Abstract 46
Introduction 47
Results 48
Discussion 63
Conclusions 70
Methods 71
References 76
Tables 84
Figures 88
CAPÍTULO 3 – Considerações finais 94
1. Síntese do trabalho 94
2. Principais resultados 94
3. Avaliação da hipótese 96
4. Limitações 96
5. Perspectivas e implicações para a avicultura 97
REFERÊNCIAS 97

ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL EM AVES COMERCIAIS: EXPLORANDO POTENCIAL PROBIÓTICO, GENES DE MULTIRESISTÊNCIA E TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES

RESUMO - A microbiota gastrointestinal de aves comerciais participa da digestão, da modulação imunológica e da resistência a patógenos, mas também atua como reservatório de genes de resistência a antimicrobianos e como fonte potencial de alternativas ao uso desses compostos. Estudos baseados em genomas reconstruídos a partir de metagenomas têm se limitado, em grande parte, a conjuntos de dados isolados, o que dificulta a identificação de padrões gerais. Nesta tese, dados metagenômicos públicos de seis estudos independentes, conduzidos em cinco países, foram integrados para construir um catálogo de genomas da microbiota gastrointestinal de *Gallus gallus domesticus*. Foram reunidos 19.730 genomas montados a partir de metagenomas (MAGs), sendo 5.601 obtidos por montagem *de novo* de 98 corridas do Sequence Read Archive e 14.129 recuperados de repositórios públicos. Após filtragem uniforme de qualidade (completude ≥85% e contaminação ≤10%), 11.224 MAGs foram mantidos e anotados quanto à taxonomia, ao potencial metabólico, aos genes de resistência, aos elementos genéticos móveis, aos fatores de virulência, aos sistemas CRISPR-Cas, à produção de bacteriocinas e ao potencial probiótico. O catálogo abrangeu 26 filos, 829 gêneros e 1.977 espécies, quase metade sem descrição formal. A composição taxonômica variou amplamente entre os estudos, enquanto as grandes categorias funcionais permaneceram estáveis. Genes de resistência adquiridos foram detectados em 13,7% dos MAGs, concentrados em gêneros comensais, e estiveram fortemente associados a sequências de inserção. Genes de importância crítica, como *optrA*, *poxtA*, *cfr*, *tet(X)*, *vanA*, *mecA* e *blaCTX-M-14*, foram raros, mas presentes em cinco dos seis estudos. *Enterococcus cecorum* apresentou a maior carga de multirresistência. Nenhum gene *mcr* foi detectado, possivelmente em razão da perda de plasmídeos durante a reconstrução dos genomas. Fatores de virulência ocorreram em 4,6% dos MAGs, sistemas CRISPR-Cas em 23,6% e agrupamentos gênicos de bacteriocinas em 14,8%. A triagem genômica de candidatos probióticos revelou um conflito entre segurança e potencial competitivo: os gêneros com maior potencial de produção de bacteriocinas foram também os mais excluídos por carregar genes de resistência adquiridos. O catálogo constitui uma referência genômica para a vigilância da resistência antimicrobiana e para a seleção racional de estratégias baseadas na microbiota na produção avícola.

Palavras-chave: bacteriocinas; genomas montados a partir de metagenomas; probióticos; resistência antimicrobiana; saúde avícola

METAGENOMIC CHARACTERIZATION OF THE GUT MICROBIOTA IN COMMERCIAL POULTRY: UNCOVERING PROBIOTIC POTENTIAL, ANTIMICROBIAL RESISTANCE, AND HORIZONTAL GENE TRANSFER

ABSTRACT - The gastrointestinal microbiota of commercial poultry contributes to digestion, immune modulation and resistance to pathogens, but it also acts as a reservoir of antimicrobial resistance genes and as a potential source of alternatives to antimicrobials. Genome-resolved studies of this ecosystem have largely been restricted to single datasets, which limits the identification of general patterns. In this thesis, public metagenomic data from six independent studies conducted in five countries were integrated to build a genome catalogue of the gastrointestinal microbiota of *Gallus gallus domesticus*. A total of 19,730 metagenome-assembled genomes (MAGs) were gathered, of which 5,601 were obtained by de novo assembly of 98 Sequence Read Archive runs and 14,129 were retrieved from public repositories. After uniform quality filtering (completeness ≥85% and contamination ≤10%), 11,224 MAGs were retained and annotated for taxonomy, metabolic potential, resistance genes, mobile genetic elements, virulence factors, CRISPR-Cas systems, bacteriocin production and probiotic potential. The catalogue encompassed 26 phyla, 829 genera and 1,977 species, nearly half of which lacked a formal description. Taxonomic composition varied widely among studies, whereas broad functional categories remained stable. Acquired resistance genes were detected in 13.7% of MAGs, were concentrated in commensal genera and were strongly associated with insertion sequences. Genes of critical relevance, such as *optrA*, *poxtA*, *cfr*, *tet(X)*, *vanA*, *mecA* and *blaCTX-M-14*, were rare but present in five of the six studies. *Enterococcus cecorum* carried the highest multidrug-resistance burden. No *mcr* gene was detected, possibly owing to the loss of plasmids during genome reconstruction. Virulence factors occurred in 4.6% of MAGs, CRISPR-Cas systems in 23.6% and bacteriocin gene clusters in 14.8%. Genomic screening of probiotic candidates revealed a trade-off between safety and competitive potential: the genera with the greatest bacteriocin potential were also those most frequently excluded for carrying acquired resistance genes. The catalogue provides a genomic reference for antimicrobial resistance surveillance and for the rational selection of microbiome-based strategies in poultry production.

Keywords: antimicrobial resistance; bacteriocins; metagenome-assembled genomes; poultry health; probiotics

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Principais países produtores, exportadores e importadores de carne de frango e ovos para consumo em escala global 5
Figura 2. Interações entre saúde humana, animal e ambiental no contexto da abordagem Saúde Única 6
Figura 3. Influência da dieta sobre a microbiota intestinal de aves 8
Figura 4. Relação entre probióticos, prebióticos e simbióticos na modulação da microbiota intestinal 10
Figura 5. Anatomia do trato gastrointestinal de aves comerciais 12
Figura 6. Principais fatores associados à modulação da microbiota intestinal aviária 15
Figura 7. Fluxo geral da abordagem de metagenômica shotgun baseada em sequenciamento de nova geração (NGS) 18
Figura 8. Principais mecanismos de transferência horizontal de genes em bactérias 29
Figura 9. Principais mecanismos bacterianos associados à resistência a antimicrobianos 33
Figura 10. Mecanismos de ação de probióticos no epitélio intestinal 41

CAPÍTULO 2 – AN INTEGRATED GENOME CATALOGUE OF THE CHICKEN GUT MICROBIOME LINKS ACQUIRED ANTIMICROBIAL RESISTANCE, MOBILITY AND PROBIOTIC POTENTIAL

Figure 1. Geographic distribution of integrated metagenomic datasets 88
Figure 2. Taxonomic composition of the genome catalogue 89
Figure 3. Functional potential of the genome catalogue 90
Figure 4. Acquired antimicrobial resistance across genera 91
Figure 5. Composite mobility score 91
Figure 6. Virulence factors in the genome catalogue 92
Figure 7. CRISPR-Cas systems in the genome catalogue 92
Figure 8. Bacteriocin biosynthetic gene clusters predicted by BAGEL4 93
Figure 9. Genomic screening of probiotic candidates 93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – AN INTEGRATED GENOME CATALOGUE OF THE CHICKEN GUT MICROBIOME LINKS ACQUIRED ANTIMICROBIAL RESISTANCE, MOBILITY AND PROBIOTIC POTENTIAL

Table 1. Metagenomic studies integrated into the genome catalogue 84
Table 2. Genome recovery, quality and taxonomic breadth per BioProject 85
Table 3. Antimicrobial resistance hits and acquired resistance across BioProjects..... 86
Table 4. Genes of critical clinical or veterinary concern detected in the catalogue..... 86

LISTA DE ABREVIAÇÕES

16S rRNA	RNA ribossomal 16S (do inglês, *16S ribosomal RNA*)
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta (do inglês, *Short-Chain Fatty Acids* ou SCFAs)
APEC	*Escherichia coli* Patogênica para Aves (do inglês, *Avian Pathogenic Escherichia coli*)
ARGs	Genes de Resistência a Antimicrobianos (do inglês, *Antimicrobial Resistance Genes*)
CAZymes	Enzimas Ativas em Carboidratos (do inglês, *Carbohydrate-Active Enzymes*)
COG	Grupos de Genes Ortólogos (do inglês, *Clusters of Orthologous Groups*)
EBI	Instituto Europeu de Bioinformática (do inglês, *European Bioinformatics Institute*)
EC	Comissão Europeia (do inglês, *European Commission*)
EggNOG	Base de dados de Grupos de Genes Ortólogos com Anotação Evolutiva (do inglês, *Evolutionary Genealogy of Genes: Non-supervised Orthologous Groups*)
FDA	Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (do inglês, *Food and Drug Administration*)
FOS	Fruto-oligossacarídeos (do inglês, *Fructooligosaccharides*)
GOS	Galacto-oligossacarídeos (do inglês*, Galactooligosaccharides*)
HGT	Transferência Horizontal de Genes (do inglês, *Horizontal Gene Transfer*)
KEGG	Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)
MAGs	Genomas Montados a partir de Metagenomas (do inglês, *Metagenome-Assembled Genomes*)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MOS	Mano-oligossacarídeos (do inglês, *Mannanoligosaccharides*)
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*)
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (do inglês, *Next-Generation Sequencing*)
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês, *World Organisation for Animal Health*) — atual WOAH
PIB	Produto Interno Bruto
PNA	Polissacarídeos Não Amiláceos
Saúde Única	Uma Só Saúde (do inglês, *One Health*)
SPI	Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* (do inglês, *Salmonella Pathogenicity Island*)
TGI	Trato Gastrointestinal
UE	União Europeia
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)
WOAH	Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês, *World Organisation for Animal Health*)

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) das aves desempenha funções essenciais para a manutenção da saúde e da produtividade, incluindo a digestão dos alimentos e a absorção de nutrientes. No entanto, essas funções não dependem exclusivamente do hospedeiro, estando diretamente associadas à presença de uma complexa comunidade de microrganismos que coloniza o ambiente intestinal. Essa comunidade, denominada microbiota intestinal, é composta por bactérias, arqueias, fungos, vírus, fagos e protozoários, cujas interações podem resultar em efeitos benéficos, neutros ou prejudiciais ao hospedeiro (Bedford, 2000; Yeoman et al., 2012; Sender et al., 2016). O equilíbrio dessa microbiota é fundamental para a homeostase intestinal, uma vez que sua desregulação pode favorecer a colonização e proliferação de microrganismos patogênicos, com implicações tanto para a saúde animal quanto para a saúde humana (Hermans et al., 2012; Florez-Cuadrado et al., 2018; Jørgensen et al., 2019).

Essa dinâmica resulta de interações complexas entre fatores microbianos e características do hospedeiro. Processos como produção de metabólitos, formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, além de mecanismos de comunicação celular, como o *quorum sensing*, desempenham papel central na estruturação dessas comunidades (Mukherjee & Bassler, 2019). Paralelamente, fatores intrínsecos às aves, como genética, dieta, idade, estado fisiológico e ciclo circadiano, influenciam diretamente a composição e a função da microbiota intestinal (Shang et al., 2018; Rychlik, 2020; Zhang et al., 2022). Como consequência, observa-se elevada variabilidade nos perfis taxonômicos e funcionais da microbiota intestinal de aves descritos na literatura, refletindo a natureza dinâmica desse ecossistema.

Ao longo do desenvolvimento do hospedeiro, o estabelecimento da microbiota intestinal ocorre de maneira progressiva. Embora o embrião aviário se desenvolva em ambiente extracorpóreo, evidências indicam que a colonização inicial pode ter origem materna, sendo transferida durante a formação do ovo (Stanley et al., 2015; Pedroso et al., 2016). Após a eclosão, a microbiota sofre rápida modulação, fortemente influenciada pelo ambiente. Em sistemas de produção comercial, nos quais a incubação ocorre de forma artificial, a colonização inicial é predominantemente ambiental, com predomínio de Enterobacteriaceae nos primeiros dias de vida, seguido pela substituição por membros das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, e posterior estabelecimento de

bactérias do filo Bacteroidota (antigo Bacteroidetes) (Yeoman et al., 2012; Videnska et al., 2014). Em contraste, aves criadas em contato com indivíduos adultos desenvolvem uma microbiota mais diversificada e estável em menor tempo, incluindo componentes frequentemente negligenciados, como vírus e arqueias (Yeoman et al., 2012).

Nas fases iniciais de vida, justamente por essa imaturidade, as aves tornam-se particularmente suscetíveis à colonização por patógenos, como espécies do gênero *Salmonella*, de grande relevância em doenças veiculadas por alimentos. Nesse cenário, estratégias que visam modular precocemente a microbiota, como a inoculação com microbiota de aves adultas, têm demonstrado potencial na redução da suscetibilidade a infecções (Rantala & Nurmi, 1973; Varmuzova et al., 2016; Kubasova et al., 2019). Com o avançar do desenvolvimento, a microbiota intestinal não apenas se diversifica taxonomicamente, mas também amplia sua capacidade funcional, passando a desempenhar papéis metabólicos mais complexos, incluindo o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e vitaminas (Ding et al., 2017). A compreensão integrada da estrutura e função da microbiota ao longo do desenvolvimento do hospedeiro é, portanto, essencial para elucidar suas implicações biológicas.

Do ponto de vista tecnológico, os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA revolucionaram o estudo de comunidades microbianas. Desde a introdução do sequenciamento por Sanger (Sanger & Coulson, 1975) até o desenvolvimento das plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (do inglês, *Next-Generation Sequencing* ou NGS), houve aumento expressivo na capacidade de geração de dados genômicos, o que possibilitou análises mais abrangentes e detalhadas (Levy & Myers, 2016). Mais recentemente, as tecnologias de leitura longa, como o sequenciamento por nanoporos e as leituras longas de alta fidelidade (do inglês, *high-fidelity* ou HiFi), ampliaram ainda mais esse potencial, ao permitir a reconstrução de genomas microbianos mais completos e contíguos (Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022). Nesse cenário, a metagenômica emergiu como abordagem central para o estudo de microbiomas, permitindo a análise direta do DNA total presente em uma amostra, independentemente do cultivo dos microrganismos (Handelsman et al., 1998; Oulas et al., 2015).

Quanto à classificação, as abordagens metagenômicas podem ser divididas em estratégias direcionadas e não direcionadas. O sequenciamento do gene 16S rRNA (RNA ribossomal 16S de bactérias) tem sido amplamente utilizado para caracterização taxonômica, mas apresenta limitações, como baixa resolução em nível de espécie e ausência de informações funcionais detalhadas, além de não contemplar adequadamente

vírus e fungos (Hillmann et al., 2018). Em contrapartida, o sequenciamento metagenômico *shotgun* permite uma análise mais abrangente da diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas, embora envolva desafios relacionados à complexidade dos dados, fragmentação do DNA e dificuldades na reconstrução de genomas individuais (Joseph & Pe'er, 2021). Ainda assim, o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática tem possibilitado avanços significativos, incluindo a reconstrução de genomas a partir de metagenomas (do inglês, *Metagenome-Assembled Genome* ou MAGs), análises taxonômicas baseadas em bancos de dados de referência e a identificação de funções metabólicas.

Complementarmente às análises convencionais, outras abordagens têm ampliado a compreensão das interações dentro das comunidades microbianas. Análises de coocorrência permitem inferir relações ecológicas entre microrganismos e identificar espécies-chave na estruturação da comunidade (Siles et al., 2021), enquanto estudos longitudinais possibilitam investigar a dinâmica temporal da microbiota e os fatores que influenciam seu estabelecimento e estabilidade (Shang et al., 2018; Rychlik, 2020; Zhang et al., 2022). Já a identificação de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos fornece informações relevantes sobre o potencial patogênico das comunidades e sobre a disseminação da resistência, frequentemente associada à transferência horizontal de genes mediada por elementos genéticos móveis (Brown, 2003; Frost et al., 2005; Partridge et al., 2018). Esses aspectos são particularmente relevantes no contexto de "Uma Só Saúde" ou "Saúde Única" (do inglês, *One Health*), dada a interconexão entre saúde animal, humana e ambiental (Hermans et al., 2012; Florez-Cuadrado et al., 2018; Jørgensen et al., 2019).

Mais recentemente, a investigação de sistemas de defesa bacterianos, como o CRISPR-Cas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated proteins*), tem contribuído para a compreensão das interações entre bactérias, bacteriófagos e elementos genéticos móveis (Marraffini, 2015; Makarova et al., 2020). Como os espaçadores desses sistemas derivam de fragmentos de DNA de invasores previamente encontrados, sua análise funciona como um registro das exposições passadas de cada linhagem bacteriana. A identificação desses sistemas em genomas reconstruídos a partir de metagenomas, com ferramentas dedicadas de detecção e classificação (Russel et al., 2020), permite assim compreender os mecanismos de defesa das comunidades microbianas e as pressões que moldam sua evolução.

Apesar desses avanços, os estudos genômicos da microbiota intestinal de aves comerciais permanecem, em grande parte, restritos a conjuntos de dados isolados, obtidos em uma única região, linhagem ou condição de manejo. Isso dificulta distinguir padrões gerais de características particulares de cada estudo. Ao mesmo tempo, um volume crescente de dados metagenômicos de aves tem sido depositado em repositórios públicos, o que abre a possibilidade de integrá-los sob critérios uniformes de qualidade e de análise. Diante desse cenário, o presente estudo propõe a construção de um catálogo de genomas da microbiota gastrointestinal de aves comerciais a partir de dados públicos de diferentes origens geográficas e sistemas de produção. Cada genoma foi caracterizado quanto à taxonomia, ao potencial metabólico, aos genes de resistência a antimicrobianos, aos elementos genéticos móveis, aos fatores de virulência, aos sistemas CRISPR-Cas, à produção de bacteriocinas e ao potencial probiótico, de modo a oferecer um recurso de referência para a saúde animal, a vigilância da resistência antimicrobiana e a seleção de alternativas aos antimicrobianos no contexto da Saúde Única.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Introdução ao setor avícola e relevância da microbiota

2.1.1. Mercado avícola global

A avicultura constitui um dos segmentos mais dinâmicos da produção agropecuária mundial, com papel central na segurança alimentar, na geração de renda e no comércio internacional de proteínas de origem animal. A carne de frango e os ovos têm ampla aceitação em diferentes contextos socioculturais, em função do custo relativamente acessível, do elevado valor nutricional e da ausência de restrições religiosas significativas (FAO, 2023; OECD/FAO, 2022). Nas últimas décadas, a produção avícola cresceu de forma contínua, impulsionada pelo aumento da demanda em países em desenvolvimento, pela urbanização e pela intensificação dos sistemas produtivos (Mottet & Tempio, 2017). Esse crescimento também reflete a substituição gradual de carnes vermelhas pela carne de frango, favorecida por sua melhor conversão alimentar e menor emissão de gases de efeito estufa por unidade produzida (FAO, 2023).

A produção concentra-se em países com elevada capacidade produtiva, infraestrutura consolidada e forte integração da cadeia avícola (Figura 1). O Brasil ocupa posição de destaque entre os principais produtores e exportadores de carne de frango, sustentado pela ampla disponibilidade de insumos para alimentação animal, pela elevada escala de produção e pela forte inserção no mercado internacional (ABPA, 2023). Os

Estados Unidos e a China figuram entre os maiores produtores e consumidores, enquanto a União Europeia mantém participação relevante sob regulamentações rigorosas de segurança alimentar, sustentabilidade e bem-estar animal, que influenciam padrões globais de qualidade e exigências comerciais (OECD/FAO, 2022).

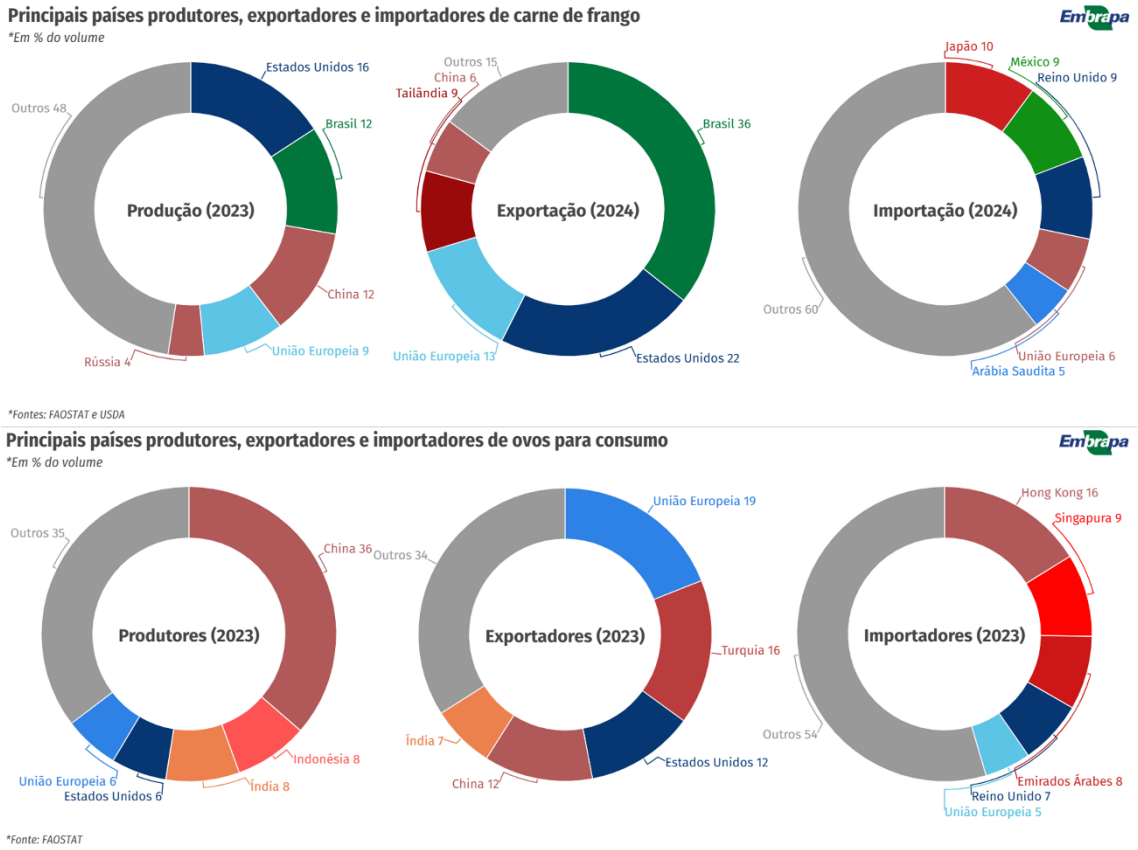


Figura 1. Principais países produtores, exportadores e importadores de carne de frango e ovos para consumo em escala global. Distribuição percentual dos principais países produtores, exportadores e importadores de carne de frango e ovos em escala global, considerando o volume comercializado entre 2023 e 2024. Dados expressos em percentual do volume total comercializado. Fonte: Adaptado de Embrapa, com dados da FAOSTAT e USDA (2025).

A intensificação dos sistemas produtivos trouxe ganhos expressivos de produtividade, mas também impôs desafios relacionados à sanidade, ao bem-estar animal e à sustentabilidade. Nesse contexto, a microbiota intestinal emerge como elemento-chave para a eficiência produtiva e a saúde dos plantéis, por sua participação na digestibilidade dos nutrientes, na modulação do sistema imunológico e na resistência à colonização por patógenos. O interesse por essas comunidades cresceu especialmente

diante das restrições ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em diversos países (Dibner & Richards, 2005; Gadde et al., 2017). A preocupação com a resistência antimicrobiana e com a segurança dos alimentos reforça a necessidade de abordagens alinhadas ao conceito de Saúde Única, que consideram as interações entre saúde animal, humana e ambiental (Figura 2) e reconhecem a microbiota como componente funcional do sistema produtivo. Ferramentas ômicas, em especial a metagenômica, têm ampliado a capacidade de caracterizar essas comunidades em níveis taxonômico e funcional (Oakley et al., 2014; Stanley et al., 2014).

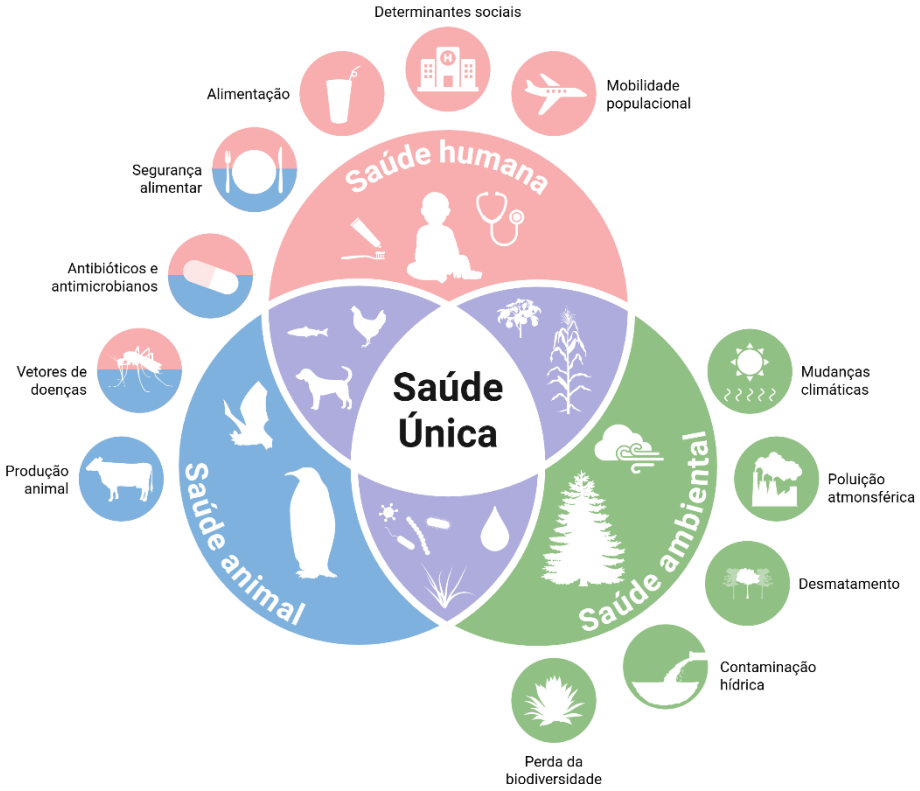


Figura 2. Interações entre saúde humana, animal e ambiental no contexto da abordagem Saúde Única. Diagrama ilustrando a integração entre fatores ambientais, produção animal, saúde humana e disseminação de doenças, destacando a natureza interdisciplinar da abordagem Saúde Única. Fonte: Elaboração própria utilizando o BioRender.

2.1.2. Sistema de criação e linhagens comerciais

A produção avícola contemporânea baseia-se em diferentes modelos de criação, que variam quanto ao grau de intensificação, ao manejo, ao bem-estar animal e ao controle ambiental. Em termos gerais, esses modelos podem ser classificados em

intensivos, semi-intensivos, extensivos e alternativos, incluindo sistemas orgânicos e criações ao ar livre (do inglês, *free-range*). O sistema intensivo predomina na produção global e caracteriza-se por elevada densidade populacional e rigoroso controle de temperatura, ventilação, luminosidade e alimentação, o que permite maior padronização dos lotes e eficiência produtiva (OECD/FAO, 2022; ABPA, 2023). Ao mesmo tempo, a concentração de animais em espaços reduzidos favorece a disseminação de microrganismos e exige protocolos rigorosos de biosseguridade. Nos sistemas alternativos, as aves têm maior liberdade de movimento e, com frequência, acesso a ambientes externos, o que amplia sua exposição a microrganismos ambientais. Essa exposição pode resultar em microbiotas intestinais mais diversas, mas também em maior variabilidade e risco de contato com patógenos (Stanley et al., 2014). Os sistemas orgânicos, por sua vez, restringem o uso de antibióticos e incentivam estratégias alternativas, como probióticos e prebióticos (Gadde et al., 2017).

O melhoramento genético também desempenha papel determinante na produção avícola. As linhagens comerciais modernas de frangos de corte, como Ross, Cobb e Hubbard, foram desenvolvidas por programas intensivos de seleção para ganho de peso, conversão alimentar, rendimento de carcaça e uniformidade dos lotes. Paralelamente, linhagens de postura, como Lohmann Brown, e raças locais ou de crescimento lento, como as galinhas de pescoço pelado e as Silkie, atendem a outros objetivos produtivos e mercados. Diferentes linhagens podem apresentar perfis microbianos distintos mesmo quando mantidas sob condições ambientais semelhantes, o que indica que características genéticas, imunológicas e fisiológicas do hospedeiro contribuem para a seleção e a manutenção de comunidades microbianas específicas (Oakley et al., 2014; Kers et al., 2018). Por outro lado, o crescimento acelerado das linhagens modernas pode gerar descompassos entre o desenvolvimento corporal e a maturação do trato gastrointestinal (TGI), com possíveis efeitos sobre a estabilidade da microbiota e a resposta a desafios sanitários.

A interação entre sistema de criação, genética e microbiota representa, assim, um desafio e uma oportunidade para a avicultura. Investigar a microbiota intestinal em diferentes linhagens e contextos produtivos contribui para uma compreensão mais integrada dos fatores que modulam o desempenho e a sanidade das aves, e fornece subsídios para estratégias de produção mais sustentáveis e resilientes.

2.2.Fatores que influenciam a microbiota intestinal em aves

2.2.1. Alimentação e nutrição

A alimentação constitui um dos principais determinantes da estrutura e da funcionalidade da microbiota intestinal em aves, atuando como fator central na modulação das interações entre microrganismos e hospedeiro. A dieta não apenas fornece os nutrientes necessários ao crescimento e à manutenção do organismo, mas também define a disponibilidade de substratos que sustentam a atividade metabólica das comunidades microbianas. Alterações na composição da ração, mesmo que sutis, podem resultar em mudanças significativas na estrutura e estabilidade da microbiota, com impactos diretos sobre a digestibilidade dos nutrientes, a integridade intestinal e a resposta imunológica das aves (Stanley et al., 2014; Apajalahti & Vienola, 2016) (Figura 3).

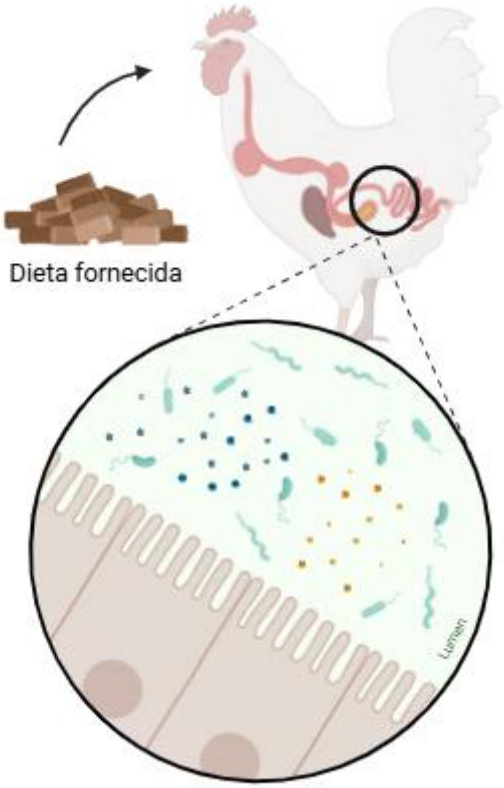


Figura 3. Influência da dieta sobre a microbiota intestinal de aves. Representação esquemática da modulação da microbiota intestinal pela dieta, destacando a interação entre os componentes alimentares e os microrganismos presentes no trato gastrointestinal. Fonte: Elaboração própria utilizando BioRender.

Comercialmente, as dietas convencionais utilizadas na avicultura são predominantemente formuladas à base de milho e farelo de soja, com o objetivo de atender às exigências nutricionais específicas de cada fase de desenvolvimento das aves. Esses ingredientes constituem importantes fontes de energia, proteínas e aminoácidos essenciais. Entretanto, parte de seus componentes não é completamente digerida no intestino delgado, permitindo que frações não digeríveis alcancem os segmentos distais do TGI. Entre essas frações destacam-se os polissacarídeos não amiláceos (PNA), passíveis de fermentação pela microbiota intestinal. A metabolização desses compostos resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato, metabólitos associados à manutenção da saúde intestinal por atuarem tanto como fonte energética para enterócitos quanto na modulação de processos inflamatórios (Apajalahti & Vienola, 2016). Em contrapartida, dietas desbalanceadas ou caracterizadas pelo excesso de determinados nutrientes podem alterar a dinâmica microbiana intestinal, favorecendo a proliferação de microrganismos potencialmente indesejáveis e aumentando o risco de disbiose.

Quanto à fração proteica da dieta, esta também exerce influência significativa sobre a microbiota intestinal. Proteínas não digeridas que chegam ao intestino grosso tornam-se substrato para bactérias proteolíticas, resultando na produção de metabólitos potencialmente tóxicos, como amônia, aminas biogênicas e compostos fenólicos, que podem comprometer a integridade da mucosa intestinal e favorecer a colonização por patógenos (Apajalahti & Vienola, 2016).

Entre as estratégias de intervenção, o uso de aditivos alimentares constitui uma das principais formas de modulação da microbiota intestinal na produção avícola. Durante décadas, antimicrobianos foram incorporados às dietas como promotores de crescimento em virtude de sua capacidade de reduzir a carga microbiana e melhorar a eficiência alimentar. A restrição progressiva dessa prática, impulsionada por preocupações relacionadas à resistência antimicrobiana, levou à intensificação de pesquisas voltadas à identificação de alternativas capazes de desempenhar funções semelhantes sem os riscos associados ao uso contínuo de antibióticos (Dibner & Richards, 2005; Gadde et al., 2017). Dentre essas alternativas, os probióticos têm recebido destaque por sua capacidade de influenciar diretamente a composição microbiana. Microrganismos pertencentes a gêneros como *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium* são frequentemente utilizados devido à sua habilidade de sobreviver às condições do TGI e interagir com o hospedeiro. Esses organismos podem competir com patógenos por sítios de adesão e nutrientes, além

de produzir substâncias antimicrobianas que limitam o crescimento de microrganismos indesejáveis (Gadde et al., 2017). Já os prebióticos atuam por um mecanismo distinto, baseado na disponibilização de substratos seletivos para microrganismos benéficos. Compostos como frutooligossacarídeos, inulina e mananoligossacarídeos são fermentados por bactérias comensais, favorecendo sua proliferação e atividade metabólica. Esse processo contribui para a produção de metabólitos que auxiliam na manutenção da integridade intestinal e na regulação da resposta imune (Gibson & Roberfroid, 1995; Gibson et al., 2017). A combinação dessas duas abordagens, na forma de simbióticos, busca potencializar os efeitos observados individualmente, promovendo maior estabilidade da microbiota (Figura 4).

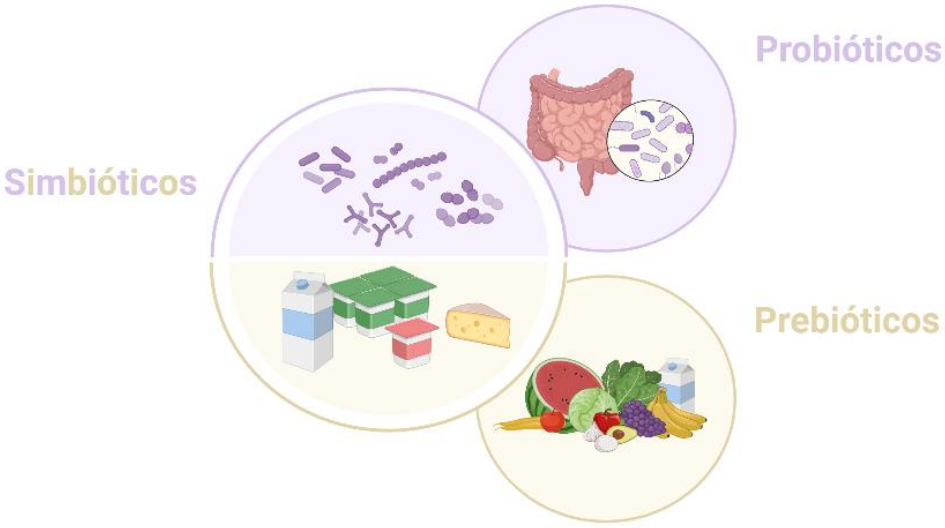


Figura 4. Relação entre probióticos, prebióticos e simbióticos na modulação da microbiota intestinal. Diagrama representando os conceitos de prebióticos, probióticos e simbióticos, bem como suas interações funcionais e aplicações na modulação da microbiota intestinal. Fonte: Elaboração própria utilizando o BioRender.

Além dessas abordagens, outros aditivos, como enzimas exógenas, ácidos orgânicos, compostos fitogênicos e ácidos graxos de cadeia média, também vêm sendo empregados com o objetivo de melhorar a digestibilidade dos nutrientes e modular a composição microbiana intestinal. Enzimas como xilanases e β-glucanases auxiliam na degradação de polissacarídeos não amiláceos, reduzindo a viscosidade intestinal e aumentando a disponibilidade de nutrientes, fatores que podem impactar positivamente a

estrutura da microbiota (Bedford, 2000). De maneira semelhante, ácidos orgânicos contribuem para a redução do pH intestinal, criando condições menos favoráveis ao desenvolvimento de bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Essa interação entre dieta e microbiota estende-se, ainda, à regulação do sistema imunológico. Metabólitos produzidos por microrganismos intestinais atuam como sinalizadores capazes de influenciar a expressão gênica do hospedeiro e a atividade de células imunes. Esse diálogo metabólico reforça o papel da microbiota como componente ativo na manutenção da homeostase intestinal, particularmente em sistemas produtivos intensivos, nos quais as aves estão frequentemente expostas a desafios ambientais e sanitários (Oakley et al., 2014).

Em síntese, a alimentação configura-se como um dos principais mecanismos de intervenção sobre a microbiota intestinal em aves comerciais. A formulação de dietas equilibradas, aliada ao uso criterioso de aditivos, contribui para a manutenção de um ambiente intestinal mais estável e resiliente, favorecendo microrganismos benéficos e restringindo a proliferação de patógenos. Compreender essas interações entre nutrição e microbiota torna-se, portanto, fundamental para o desenvolvimento de sistemas produtivos mais eficientes, sustentáveis e compatíveis com as demandas contemporâneas da avicultura.

2.2.2. Trato gastrointestinal (TGI) de aves

O TGI das aves apresenta características anatômicas e fisiológicas altamente especializadas, resultantes de adaptações evolutivas associadas à rápida digestão e ao eficiente aproveitamento de nutrientes. Essas particularidades influenciam diretamente a colonização, a estrutura e a dinâmica da microbiota intestinal, configurando um ambiente heterogêneo no qual diferentes compartimentos sustentam comunidades microbianas distintas. A compreensão detalhada da anatomia e fisiologia do trato digestório aviário (Figura 5) torna-se, assim, essencial para interpretar as interações estabelecidas entre o hospedeiro e sua microbiota, bem como suas implicações para a saúde intestinal e o desempenho produtivo.

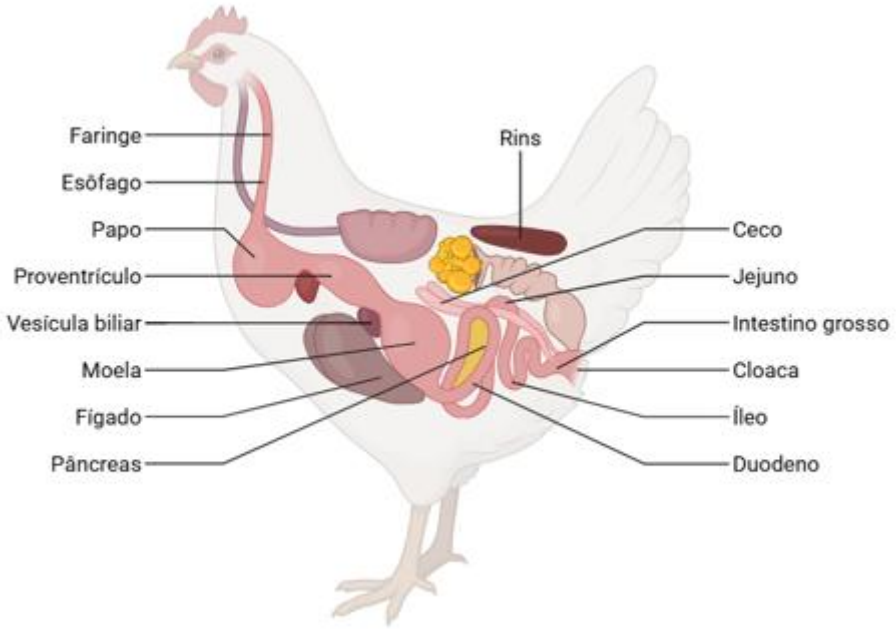


Figura 5. Anatomia do trato gastrointestinal de aves comerciais. Representação anatômica das principais estruturas do trato gastrointestinal aviário, incluindo órgãos digestórios e segmentos intestinais associados ao processo digestivo. Fonte: Elaboração própria utilizando o BioRender.

Estruturalmente, o sistema digestório aviário é constituído por órgãos funcionalmente especializados, incluindo bico, esôfago, inglúvio (papo), proventrículo, moela, intestino delgado (subdividido em duodeno, jejuno e íleo), cecos, intestino grosso e cloaca. O inglúvio atua como um reservatório temporário de alimento, permitindo sua umidificação e o início dos processos digestivos. O proventrículo corresponde ao estômago glandular, responsável pela secreção de enzimas digestivas e ácido clorídrico, enquanto a moela exerce função mecânica ao promover a trituração dos alimentos. A integração entre digestão química e mecânica contribui para elevada eficiência digestiva e, simultaneamente, estabelece condições físico-químicas específicas que favorecem a colonização microbiana diferencial ao longo dos distintos segmentos intestinais (Apajalahti & Vienola, 2016).

No intestino delgado ocorre a maior parte da digestão e absorção de nutrientes, sendo esse segmento caracterizado por rápida taxa de passagem do alimento e, consequentemente, por menor densidade microbiana em comparação com as porções distais do TGI. Ainda assim, os microrganismos presentes nessa região exercem funções relevantes, incluindo a metabolização de nutrientes e a modulação da resposta imune

local. Em contraste, os cecos constituem o principal sítio de fermentação microbiana em aves, abrigando comunidades altamente diversas e metabolicamente ativas. Nesse ambiente ocorre a fermentação de carboidratos não digeríveis, resultando na produção de AGCC, metabólitos que contribuem tanto para a nutrição do hospedeiro quanto para a manutenção da integridade da mucosa intestinal (Oakley et al., 2014; Stanley et al., 2014).

Essa organização estrutural do trato digestório, associada a fatores como pH, disponibilidade de oxigênio, secreções digestivas e velocidade de trânsito intestinal, estabelece nichos ecológicos distintos ao longo dos diferentes compartimentos intestinais, favorecendo a colonização seletiva por grupos microbianos específicos. Regiões proximais, como proventrículo e duodeno, apresentam pH mais ácido e maior disponibilidade de oxigênio, condições que limitam a diversidade microbiana. Em contrapartida, regiões distais, especialmente os cecos, caracterizam-se por ambiente predominantemente anaeróbio e maior disponibilidade de substratos fermentáveis, favorecendo o crescimento de bactérias estritamente anaeróbias (Apajalahti & Vienola, 2016).

Logo após a eclosão, tem início o processo de colonização microbiana intestinal, que ocorre de maneira progressiva e dinâmica. Nos primeiros dias de vida, a microbiota apresenta composição relativamente simples e instável, fortemente influenciada por fatores ambientais, como o contato com superfícies, água, alimento e outros animais. Nessa fase inicial, observa-se com frequência o predomínio de bactérias da família Enterobacteriaceae, posteriormente substituídas por comunidades mais complexas e estáveis, compostas principalmente por membros dos filos Bacillota (antigo Firmicutes) e Bacteroidota (antigo Bacteroidetes) (Yeoman et al., 2012; Videnska et al., 2014). Esse processo de sucessão microbiana está intimamente associado ao desenvolvimento do sistema imunológico e à maturação funcional do trato digestório.

Cabe destacar que a velocidade e a trajetória desse processo de colonização podem variar significativamente conforme as condições de criação. Em sistemas comerciais, nos quais a incubação ocorre de forma artificial e há ausência de contato com aves adultas, a colonização inicial depende majoritariamente de fontes ambientais, o que pode resultar em maior variabilidade na composição microbiana. Por outro lado, em sistemas naturais, o contato com a microbiota materna favorece o estabelecimento mais rápido de uma comunidade estável e diversificada (Stanley et al., 2015; Pedroso et al., 2016). Essa diferença tem implicações diretas na suscetibilidade das aves a patógenos durante as primeiras semanas de vida.

Do ponto de vista imunológico, a microbiota intestinal desempenha papel fundamental na maturação do sistema imunológico das aves, contribuindo para o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra patógenos. A interação entre microrganismos e células do sistema imune estimula a produção de citocinas, a ativação de células imunes e o fortalecimento da barreira intestinal. Além disso, a microbiota atua na exclusão competitiva de patógenos, ocupando nichos ecológicos e competindo por nutrientes, o que dificulta a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos (Oakley et al., 2014).

Outro aspecto relevante diz respeito à comunicação entre microrganismos e hospedeiro, mediada por metabólitos microbianos e sinais químicos. Compostos como os AGCC desempenham funções regulatórias importantes, influenciando a expressão gênica do hospedeiro, a integridade da mucosa intestinal e a resposta inflamatória. Esses mecanismos evidenciam a natureza simbiótica da relação entre microbiota e hospedeiro, na qual alterações na composição microbiana podem resultar em consequências fisiológicas significativas.

Além das características intrínsecas do hospedeiro, fatores como dieta, uso de antimicrobianos, estresse e condições ambientais exercem influência direta sobre a estrutura e a estabilidade da microbiota intestinal, podendo favorecer estados de disbiose (Figura 6). Esse desequilíbrio encontra-se associado a alterações na função intestinal, redução da eficiência alimentar e maior suscetibilidade a doenças infecciosas. A manutenção de uma microbiota equilibrada é, assim, atualmente considerada um componente central para a saúde intestinal e o desempenho produtivo das aves.

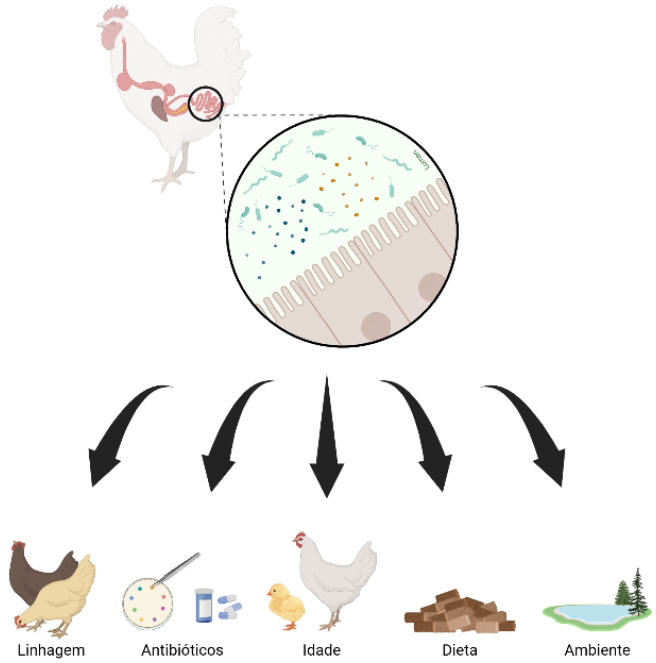


Figura 6. Principais fatores associados à modulação da microbiota intestinal aviária. Esquema ilustrando os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal em aves, incluindo linhagem genética, uso de antibióticos, idade, dieta e ambiente de criação. Fonte: Elaboração própria utilizando BioRender.

Sob essa perspectiva, o TGI aviário deve ser compreendido não apenas como um sistema voltado à digestão e absorção de nutrientes, mas como um ecossistema complexo e dinâmico, no qual interações entre fatores anatômicos, fisiológicos e microbianos determinam o estado de saúde do hospedeiro. A integração desses elementos torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias direcionadas à modulação da microbiota intestinal, contribuindo para modelos produtivos mais eficientes, sustentáveis e alinhados às demandas contemporâneas da avicultura.

2.3.Microbiota e microbioma em aves comerciais

2.3.1. Conceitos básicos: microbiota *vs*. microbioma

O avanço das pesquisas em ecologia microbiana e biologia molecular trouxe à tona a necessidade de definições mais precisas para descrever as comunidades microbianas associadas a diferentes ambientes e hospedeiros. Nesse contexto, os termos “microbiota” e “microbioma” são frequentemente utilizados, muitas vezes de forma intercambiável, embora representem conceitos distintos e complementares. A distinção

entre esses termos é fundamental para a correta interpretação dos estudos e para a padronização da linguagem científica na área.

Etimologicamente, o termo microbiota deriva do grego *micro-* (pequeno) e *bios* (vida), sendo originalmente utilizado para descrever o conjunto de microrganismos presentes em um determinado ambiente. Atualmente, refere-se às comunidades microbianas vivas associadas a diferentes nichos ecológicos, incluindo bactérias, arqueias, fungos, vírus e protozoários (Cabrera & Monte, 2024). No contexto do TGI das aves, essa comunidade é composta por populações que interagem entre si e com o hospedeiro, estabelecendo relações que podem variar de mutualísticas a potencialmente patogênicas. A composição da microbiota é altamente dinâmica, sendo influenciada por fatores como dieta, idade, genética e condições ambientais, conforme discutido nas seções anteriores (Ley et al., 2008; Oakley et al., 2014).

Já a noção de microbioma amplia essa perspectiva ao incorporar não apenas os microrganismos presentes, mas também seu conteúdo genético e funcional. O termo foi inicialmente definido por Whipps e colaboradores em 1988 e posteriormente popularizado por Joshua Lederberg para descrever o conjunto de genomas microbianos e o ecossistema associado (Cabrera & Monte, 2024). Em sua interpretação contemporânea, o microbioma engloba genes, vias metabólicas, produtos microbianos e as interações estabelecidas entre os microrganismos e o ambiente em que estão inseridos (Marchesi & Ravel, 2015). Essa distinção permite diferenciar a descrição da composição microbiana da análise de suas funções, o que se torna particularmente relevante em estudos que buscam compreender processos metabólicos e interações ecológicas.

Do ponto de vista histórico, a caracterização da microbiota baseava-se em métodos cultivo-dependentes, nos quais microrganismos eram isolados e estudados em condições laboratoriais. Essa abordagem, embora tenha contribuído significativamente para a microbiologia clássica, apresenta limitações importantes, uma vez que grande parte dos microrganismos presentes em ambientes naturais não pode ser cultivada por métodos convencionais. Estimativas indicam que apenas uma fração reduzida da diversidade microbiana total é acessível por essas técnicas, o que restringe a compreensão da complexidade real dessas comunidades (Amann et al., 1995).

Com o desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo, especialmente as baseadas em sequenciamento de DNA, esse cenário mudou de forma significativa. O sequenciamento do gene 16S rRNA tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada para a caracterização taxonômica de comunidades bacterianas, permitindo a identificação de

microrganismos a partir de regiões conservadas e variáveis desse gene (Woese & Fox, 1977). Essa abordagem viabilizou a análise de comunidades complexas sem a necessidade de cultivo, ampliando consideravelmente o conhecimento sobre diversidade microbiana. Apesar de sua utilidade, o sequenciamento de 16S rRNA apresenta limitações que impactam a interpretação dos resultados: a resolução taxonômica restrita, especialmente em nível de espécie, e a ausência de informações diretas sobre funções metabólicas limitam sua capacidade de descrever o papel funcional das comunidades microbianas (Hillmann et al., 2018). Essas limitações motivaram o desenvolvimento e a adoção de abordagens mais abrangentes.

Nesse sentido, a metagenômica *shotgun* consolidou-se como uma dessas abordagens, permitindo o sequenciamento do DNA total presente em uma amostra (Figura 7). Essa técnica possibilita a identificação simultânea de diferentes grupos de microrganismos e a análise de seu potencial funcional, incluindo a detecção de genes associados a metabolismo, resistência antimicrobiana e virulência (Oulas et al., 2015; Quince et al., 2017). A partir dessas análises, torna-se possível reconstruir o repertório funcional do microbioma, ampliando a compreensão das interações entre microrganismos e hospedeiro.

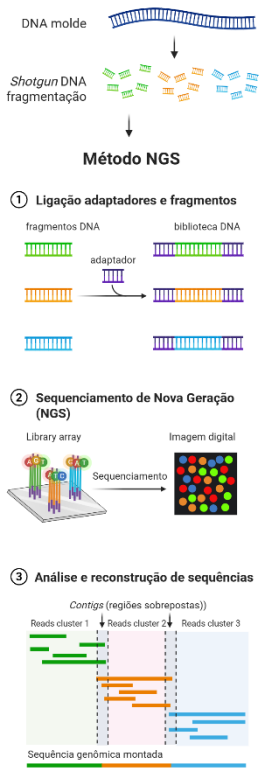


Figura 7. Fluxo geral da abordagem de metagenômica *shotgun* baseada em sequenciamento de nova geração (NGS). Etapas gerais do sequenciamento metagenômico *shotgun*, incluindo fragmentação do DNA, construção de bibliotecas, sequenciamento de nova geração e reconstrução computacional das sequências. Fonte: Elaboração própria utilizando BioRender.

Outras abordagens ômicas têm complementado essa perspectiva, fornecendo informações sobre a atividade metabólica em diferentes níveis. A metatranscriptômica permite avaliar a expressão gênica das comunidades microbianas, enquanto a metaproteômica e a metabolômica oferecem informações sobre proteínas produzidas e metabólitos gerados. A integração dessas abordagens contribui para uma visão mais completa do microbioma, aproximando a análise de seu estado funcional em condições reais (Franzosa et al., 2015).

No contexto da avicultura, essa distinção conceitual entre microbiota e microbioma é particularmente relevante, uma vez que a simples identificação dos microrganismos presentes não é suficiente para explicar seus efeitos sobre a saúde e o desempenho das aves. A compreensão do microbioma, incluindo suas funções metabólicas e interações ecológicas, permite identificar microrganismos-chave, vias metabólicas relevantes e potenciais alvos para intervenções nutricionais ou terapêuticas. Essa abordagem integrada é essencial para o desenvolvimento de estratégias que visem otimizar a saúde intestinal, melhorar a eficiência alimentar e reduzir a incidência de doenças.

Adicionalmente, o estudo do microbioma está diretamente relacionado ao conceito de holobionte, no qual o hospedeiro e sua microbiota são considerados uma unidade biológica integrada. Nessa perspectiva, a saúde do hospedeiro é vista como resultado da interação entre seus próprios processos fisiológicos e a atividade de sua microbiota, reforçando a importância de abordagens sistêmicas na compreensão dos mecanismos envolvidos (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

Em suma, a evolução conceitual e metodológica observada nas últimas décadas ampliou significativamente o entendimento das comunidades microbianas associadas ao TGI. A distinção entre microbiota e microbioma, aliada ao avanço das tecnologias de sequenciamento, fornece a base para investigações mais aprofundadas sobre diversidade, função e dinâmica dessas comunidades. Esse arcabouço conceitual sustenta os estudos

contemporâneos em microbiologia aplicada à produção animal e orienta a interpretação de dados metagenômicos em sistemas complexos.

2.3.2. Bactérias predominantes no trato gastrointestinal aviário

A microbiota intestinal das aves é composta por uma comunidade diversa e funcionalmente integrada, cuja organização reflete tanto as características do ambiente intestinal quanto as interações entre microrganismos e hospedeiro. Embora exista variabilidade entre indivíduos, sistemas de criação e fases de desenvolvimento, alguns grupos bacterianos são consistentemente descritos como dominantes no TGI aviário. Esses grupos desempenham funções essenciais na digestão, na produção de metabólitos e na manutenção da homeostase intestinal, sendo frequentemente associados ao estado de saúde e ao desempenho produtivo das aves (Oakley et al., 2014; Kers et al., 2018).

Antes de descrever esses grupos, cabe uma observação sobre nomenclatura. Em 2021, os nomes dos filos de procariotos foram formalmente padronizados, passando a seguir a terminação "-ota" (Oren & Garrity, 2021). Assim, Firmicutes passou a ser denominado Bacillota, Bacteroidetes passou a Bacteroidota, Proteobacteria passou a Pseudomonadota e Actinobacteria passou a Actinomycetota. A taxonomia baseada em genomas do Genome Taxonomy Database (GTDB), adotada nesta tese, segue essa nomenclatura e subdivide alguns filos tradicionais com base em critérios filogenéticos, como ocorre com Bacillota, Bacillota_A e Bacillota_C (Parks et al., 2022). Nesta revisão, os nomes atuais são utilizados, com a denominação anterior indicada entre parênteses na primeira menção, para facilitar a correspondência com a literatura.

Entre os filos mais representativos da microbiota intestinal aviária, Bacillota (antigo Firmicutes) destaca-se como componente predominante ao longo de todo o TGI e, especialmente, nos cecos. Esse filo reúne bactérias com elevada capacidade fermentativa, envolvidas na degradação de carboidratos complexos e na produção de AGCC. Membros das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, bem como do gênero *Faecalibacterium*, estão entre os principais produtores de butirato, metabólito importante para a nutrição dos enterócitos e para a modulação de processos inflamatórios (Louis & Flint, 2009; Apajalahti & Vienola, 2016). Os lactobacilos, por sua vez, predominam nas regiões proximais do intestino e contribuem para a exclusão competitiva de patógenos por meio da produção de ácido lático e de outras substâncias antimicrobianas, razão pela qual diversos de seus representantes são empregados como probióticos na produção avícola. O filo também inclui microrganismos de importância

sanitária, como *Clostridium perfringens*, agente da enterite necrótica, e *Enterococcus cecorum*, reconhecido como patógeno emergente associado a espondilite e osteomielite em frangos de corte (Jung et al., 2018).

Já o filo Bacteroidota (antigo Bacteroidetes), embora geralmente menos abundante que Bacillota, apresenta elevada relevância funcional. Seus representantes possuem amplo repertório enzimático para a degradação de polissacarídeos complexos, tanto de origem alimentar quanto derivados do próprio hospedeiro, como as mucinas, o que favorece o aproveitamento de componentes dietéticos não digeríveis. A atividade metabólica dessas bactérias também contribui para a produção de AGCC, em especial acetato e propionato, e para a modulação do ambiente intestinal, sobretudo em dietas com maior teor de fibras (Flint et al., 2012).

Em contraste, Pseudomonadota (antigo Proteobacteria) reúne microrganismos facultativamente anaeróbios frequentemente relacionados a estados de instabilidade da microbiota intestinal. A família Enterobacteriaceae inclui gêneros de relevância clínica e zoonótica, como *Escherichia*, *Salmonella* e *Klebsiella*. Embora esses microrganismos possam integrar microbiotas saudáveis em baixas proporções, aumentos em sua abundância têm sido associados a disbiose, inflamação intestinal e doenças entéricas, com consequentes perdas produtivas e aumento da mortalidade (Shin et al., 2015). Como discutido no item 2.2.2, a participação desse filo é maior nas fases iniciais de vida das aves, refletindo o caráter transitório e ainda instável da microbiota nesse período (Yeoman et al., 2012; Videnska et al., 2014). Também merece destaque o filo Campylobacterota, que inclui *Campylobacter jejuni*, colonizador frequente do intestino das aves e um dos principais agentes de gastroenterite bacteriana de origem alimentar em humanos (Hermans et al., 2012).

Por sua vez, Actinomycetota (antigo Actinobacteria) compõe uma fração menos abundante, porém funcionalmente relevante, da microbiota intestinal. Gêneros como *Bifidobacterium* participam da fermentação de carboidratos e da produção de metabólitos benéficos, além de contribuírem para a modulação do sistema imunológico e para a manutenção da integridade da barreira intestinal (Binda et al., 2018). Por essa razão, a presença desses microrganismos costuma ser interpretada como indicativa de maior equilíbrio ecológico intestinal.

Ao longo do TGI, os grupos bacterianos distribuem-se de maneira heterogênea, refletindo as diferenças físico-químicas entre os segmentos intestinais descritas no item 2.2.2. No intestino delgado predominam microrganismos aerotolerantes, como os

lactobacilos, enquanto os cecos abrigam comunidades anaeróbias mais complexas, dominadas por representantes de Bacillota e Bacteroidota (Oakley et al., 2014; Stanley et al., 2014).

Do ponto de vista funcional, a microbiota intestinal exerce papel central na manutenção da saúde do hospedeiro. Comunidades enriquecidas em bactérias fermentativas benéficas tendem a favorecer a digestão de nutrientes, a produção de metabólitos de interesse fisiológico e a resistência à colonização por patógenos. Em contrapartida, alterações nesse equilíbrio, incluindo aumento relativo de Proteobacteria e redução de bactérias produtoras de butirato, têm sido associadas a estados de disbiose, comprometimento da função intestinal e maior suscetibilidade a doenças (Shin et al., 2015).

Mais do que sua composição taxonômica, a funcionalidade dessas comunidades representa um aspecto central para compreender seu papel no ambiente intestinal. Diferentes grupos bacterianos participam de redes metabólicas interdependentes, nas quais a degradação de substratos complexos frequentemente depende de atividades complementares entre múltiplos microrganismos. Essa organização funcional contribui para a estabilidade ecológica da microbiota e para sua capacidade de adaptação frente a alterações ambientais e nutricionais. A compreensão da microbiota intestinal requer, assim, não apenas a identificação dos grupos presentes, mas também a investigação de suas funções e interações metabólicas.

Nas últimas décadas, a relação entre microbiota e desempenho produtivo tem recebido crescente atenção. Estudos demonstram que determinados perfis microbianos estão associados a melhor conversão alimentar e maior ganho de peso, enquanto alterações na composição da microbiota podem indicar condições subótimas de desempenho ou maior predisposição a enfermidades (Kers et al., 2018). Esses achados reforçam o potencial da microbiota intestinal tanto como indicador biológico da saúde das aves quanto como alvo estratégico de intervenções nutricionais e sanitárias.

Sob essa perspectiva, a caracterização dos principais grupos bacterianos presentes no TGI aviário constitui uma base fundamental para o entendimento das interações entre microbiota e hospedeiro. A integração entre dados taxonômicos e funcionais, particularmente por meio de abordagens metagenômicas, amplia a capacidade de interpretar essas relações e de desenvolver estratégias voltadas à promoção da saúde intestinal, à melhoria do desempenho produtivo e à sustentabilidade dos sistemas de produção avícola.

2.4.Metagenômica aplicada à avicultura

2.4.1. Repositórios públicos e metadados

O avanço das tecnologias de NGS, associado à consolidação de iniciativas de ciência aberta, promoveu uma expansão significativa na produção e disponibilização de dados genômicos e metagenômicos. Esse cenário transformou profundamente a pesquisa em microbiologia e ecologia microbiana, permitindo o acúmulo de grandes volumes de dados provenientes de diferentes ambientes, incluindo o TGI de aves. Como consequência, tornou-se possível não apenas a análise de conjuntos de dados individuais, mas também a integração de estudos independentes em abordagens comparativas de larga escala.

Nesse contexto, repositórios públicos como os mantidos pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e pelo *European Bioinformatics Institute* (EBI), além de plataformas especializadas como o MG-RAST (*Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology*), desempenham papel central no armazenamento, compartilhamento e exploração de dados de sequenciamento (Leinonen et al., 2011; Meyer et al., 2008). A disponibilidade desses recursos amplia significativamente a capacidade de realizar análises comparativas entre diferentes sistemas de produção, dietas, linhagens e condições sanitárias na avicultura.

A utilidade dessas bases, entretanto, depende diretamente da qualidade e padronização dos metadados associados às amostras. Metadados correspondem ao conjunto de informações descritivas que contextualizam os dados biológicos, incluindo características do hospedeiro, condições ambientais, dieta, localização geográfica e protocolos experimentais. A consistência dessas informações é fundamental para garantir a reprodutibilidade dos estudos e permitir comparações robustas entre diferentes conjuntos de dados. Nesse sentido, iniciativas como as diretrizes propostas pelo *Genomic Standards Consortium*, incluindo os padrões MIxS (do inglês, *Minimum Information about any (x) Sequence*), buscam estabelecer critérios mínimos para descrição e organização dos dados, promovendo maior interoperabilidade entre estudos e bases de dados (Yilmaz et al., 2011). Esses padrões incluem informações relacionadas ao hospedeiro, como espécie, idade, linhagem e estado de saúde, além de dados ambientais e experimentais, incluindo localização geográfica, tipo de amostra, condições de manejo, dieta, uso de antimicrobianos, métodos de extração de DNA e plataformas de

sequenciamento. A padronização desses metadados facilita a reprodutibilidade analítica e amplia a capacidade de integração e comparação entre diferentes estudos metagenômicos.

No contexto da avicultura, a crescente disponibilidade de dados públicos tem ampliado significativamente as possibilidades de investigação da microbiota intestinal sob diferentes perspectivas, incluindo variações associadas à dieta, ao uso de aditivos, às condições de manejo, aos sistemas de criação e à presença de patógenos. Estudos baseados em metagenômica evidenciam que a microbiota intestinal aviária apresenta elevada plasticidade, respondendo de forma dinâmica a alterações ambientais e nutricionais (Oakley et al., 2014; Stanley et al., 2014). A reutilização e integração desses conjuntos de dados permitem, assim, não apenas validar padrões previamente descritos, mas também explorar novas hipóteses e identificar tendências recorrentes em diferentes contextos produtivos.

Entre os avanços mais relevantes da metagenômica recente está a reconstrução de genomas a partir de metagenomas (do inglês, *metagenome-assembled genomes* ou MAGs). Nessa abordagem, as leituras de sequenciamento são montadas em sequências contíguas (contigs), que são então agrupadas em genomas individuais com base na composição de nucleotídeos e na cobertura de sequenciamento. A qualidade de cada MAG é estimada a partir da presença de genes marcadores de cópia única, o que permite calcular sua completude e contaminação. Com base nesses parâmetros, foram estabelecidos padrões mínimos para o relato de MAGs de alta e média qualidade (Parks et al., 2015; Bowers et al., 2017). A classificação taxonômica desses genomas é feita, em geral, pelo Genome Taxonomy Database, que posiciona cada genoma em uma árvore filogenética de referência, independentemente de o organismo ter sido cultivado (Parks et al., 2022). Essa abordagem permite atribuir genes de interesse, como os de resistência antimicrobiana, diretamente ao organismo que os carrega, o que não é possível com o sequenciamento do gene 16S rRNA ou com a análise de genes isolados.

Aplicada à microbiota intestinal de aves, a reconstrução de MAGs revelou uma grande diversidade de linhagens ainda não cultivadas. Os estudos de maior escala recuperaram centenas a milhares de genomas a partir de amostras cecais e fecais (Glendinning et al., 2020; Gilroy et al., 2021; Segura-Wang et al., 2021), e o maior catálogo publicado até o momento reuniu mais de 12 mil MAGs, utilizados para caracterizar o resistoma intestinal de frangos (Feng et al., 2021). Mais recentemente, o sequenciamento por leituras longas de alta fidelidade permitiu reconstruir genomas mais completos e contíguos da microbiota aviária (Zhang et al., 2022). Apesar desses avanços,

a maioria desses estudos baseia-se em um único conjunto de dados, obtido em uma região, linhagem ou condição de manejo específica, e a integração de múltiplas origens, raças, sistemas alimentares e contextos geográficos ainda é apontada como uma lacuna a ser preenchida (Wang et al., 2024). A integração de dados públicos sob critérios uniformes de qualidade e de anotação surge, assim, como estratégia para construir referências genômicas mais representativas da microbiota aviária.

Apesar desse potencial, a integração de dados provenientes de estudos independentes ainda apresenta desafios metodológicos importantes. Diferenças nos protocolos de coleta, extração de DNA, preparo de bibliotecas e plataformas de sequenciamento podem introduzir vieses técnicos que dificultam comparações diretas entre trabalhos. Da mesma forma, a escolha de ferramentas bioinformáticas e bancos de dados de referência pode influenciar substancialmente os resultados obtidos, especialmente em análises taxonômicas e funcionais (Quince et al., 2017). Esses fatores reforçam a necessidade de *pipelines* analíticos padronizados e da aplicação de abordagens estatísticas adequadas, de modo a garantir maior robustez e reprodutibilidade às inferências geradas a partir de dados metagenômicos.

Outro aspecto relevante diz respeito à crescente adoção de abordagens integrativas, que tem ampliado significativamente as possibilidades de exploração de dados metagenômicos. A combinação dessas informações com outras camadas ômicas, incluindo metatranscriptômica e metabolômica, além de dados fenotípicos do hospedeiro, permite investigar de maneira mais abrangente as interações entre microbiota e hospedeiro. Essa integração favorece a identificação de biomarcadores microbianos, vias metabólicas e perfis funcionais associados ao desempenho produtivo, à eficiência alimentar e à resistência a doenças, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais direcionadas no contexto da produção avícola.

O acesso a bases de dados públicas também fortalece a colaboração científica e amplia a democratização do conhecimento, permitindo que pesquisadores de diferentes contextos reutilizem dados previamente gerados para responder a novas questões biológicas. Essa dinâmica amplia o potencial analítico dos conjuntos de dados disponíveis e contribui para a construção coletiva de uma base de conhecimento mais robusta. Ainda assim, a utilização de dados secundários exige avaliação criteriosa da qualidade das informações disponíveis e consideração das limitações metodológicas associadas ao contexto experimental de origem.

Em síntese, repositórios públicos e metadados estruturados consolidam-se como componentes centrais da pesquisa metagenômica contemporânea. A capacidade de integrar e interpretar dados em larga escala permite aprofundar a compreensão das interações entre microbiota, hospedeiro e ambiente, além de identificar padrões taxonômicos e funcionais em diferentes contextos produtivos. Na avicultura, essas ferramentas oferecem suporte para análises comparativas e para o desenvolvimento de estratégias voltadas à otimização da saúde intestinal, do desempenho produtivo e da sustentabilidade dos sistemas de produção.

2.4.2. Genes anotados e vias metabólicas

A análise funcional de comunidades microbianas constitui um dos principais avanços proporcionados pelas abordagens metagenômicas. Enquanto a caracterização taxonômica descreve os microrganismos presentes em determinado ambiente, a investigação de genes e vias metabólicas possibilita explorar o potencial funcional dessas comunidades, revelando os processos bioquímicos que sustentam a dinâmica do ecossistema intestinal. No contexto da avicultura, essa perspectiva tem contribuído para elucidar como a microbiota participa da digestão de nutrientes, da produção de metabólitos e da interação com o hospedeiro.

Metodologicamente, a anotação gênica em estudos metagenômicos baseia-se na identificação de sequências codificantes e em sua associação a funções previamente descritas, geralmente por meio da comparação com bancos de dados de referência. Entre os recursos mais utilizados destacam-se KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), COG (*Clusters of Orthologous Groups*) e EggNOG (do inglês, *evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups*), que organizam genes em categorias funcionais e grupos ortológicos (Huerta-Cepas et al., 2019; Kanehisa et al., 2021). A utilização dessas ferramentas favorece a reconstrução de vias metabólicas e a identificação de padrões funcionais associados a diferentes condições experimentais, dietas e sistemas de produção, oferecendo uma visão mais integrada do microbioma intestinal.

Entre as funções metabólicas mais relevantes no TGI aviário destacam-se aquelas relacionadas à degradação de carboidratos complexos, particularmente mediadas pelas enzimas conhecidas como CAZymes (do inglês, *Carbohydrate-Active enZymes* ou Enzimas Ativas em Carboidratos). Esse grupo inclui glicosidases, glicosiltransferases, polissacarídeo-liases e carboidrato-esterases, responsáveis pela degradação de

polissacarídeos estruturais e compostos não digeríveis pelo hospedeiro, como celulose, hemicelulose e pectinas (Lombard et al., 2014). A ação dessas enzimas promove a liberação de açúcares fermentáveis, posteriormente convertidos pela microbiota em AGCC, metabólitos associados ao fornecimento energético e à manutenção da integridade intestinal. A abundância e diversidade de CAZymes no microbioma intestinal frequentemente refletem a composição da dieta, especialmente o teor de fibras e carboidratos complexos disponíveis no ambiente intestinal.

Além da degradação de carboidratos, a microbiota intestinal também participa ativamente do metabolismo de proteínas e aminoácidos, bem como da biossíntese de vitaminas e cofatores essenciais. Genes envolvidos em vias relacionadas à síntese de vitaminas do complexo B e vitamina K são frequentemente identificados em microbiomas intestinais, sugerindo uma contribuição direta dessas comunidades microbianas para a nutrição do hospedeiro (Rowland et al., 2018). A presença dessas funções metabólicas reforça o caráter simbiótico da interação entre microbiota e hospedeiro, evidenciando como os microrganismos intestinais complementam processos fisiológicos fundamentais.

Entre os aspectos mais relevantes da análise funcional em estudos metagenômicos está a identificação de genes associados à resistência a antimicrobianos e a fatores de virulência. O conjunto desses elementos, frequentemente denominado resistoma e viruloma, fornece informações importantes sobre o potencial adaptativo e patogênico das comunidades microbianas presentes no TGI aviário. Genes relacionados à resistência a diferentes classes de antibióticos, incluindo β-lactâmicos, tetraciclinas e macrolídeos, podem ser detectados mesmo na ausência de pressão seletiva direta, evidenciando a ampla disseminação desses determinantes genéticos em microbiomas intestinais (Van Boeckel et al., 2015).

Parte desses genes encontra-se associada a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, favorecendo sua transferência horizontal entre diferentes espécies bacterianas (Frost et al., 2005; Partridge et al., 2018). Essa característica amplia as implicações do microbioma intestinal para a saúde pública, especialmente diante do potencial de disseminação de genes de resistência ao longo da cadeia produtiva e alimentar.

De maneira semelhante, a identificação de fatores de virulência permite inferir o potencial patogênico de determinadas comunidades microbianas. Esses fatores incluem genes envolvidos em processos como adesão celular, invasão tecidual, evasão do sistema imunológico e produção de toxinas (Kaper et al., 2004). A detecção dessas características

em análises metagenômicas fornece informações relevantes sobre o risco associado à presença de microrganismos potencialmente patogênicos, incluindo representantes dos gêneros *Salmonella* e *Escherichia*.

Cabe ressaltar que a interpretação de dados funcionais em estudos metagenômicos exige cautela, uma vez que a presença de um gene não implica necessariamente sua expressão ou atividade metabólica efetiva. Essa distinção entre potencial funcional e atividade biológica representa um dos principais desafios da metagenômica funcional. Nesse contexto, abordagens complementares, como metatranscriptômica e metaproteômica, permitem avaliar padrões de expressão gênica e produção proteica, fornecendo informações mais próximas do estado funcional real das comunidades microbianas (Franzosa et al., 2015).

A utilização de ferramentas de anotação funcional também apresenta limitações associadas à qualidade e abrangência dos bancos de dados de referência. Muitas sequências identificadas em análises metagenômicas ainda não possuem função conhecida, refletindo lacunas importantes no conhecimento sobre a diversidade microbiana. Além disso, diferenças entre bancos de dados, algoritmos de anotação e critérios de classificação podem influenciar os resultados obtidos, exigindo rigor metodológico na interpretação e validação das análises funcionais.

Apesar dessas limitações, a investigação de genes e vias metabólicas tem ampliado significativamente a compreensão da microbiota intestinal em aves. Evidências indicam que determinados perfis funcionais estão associados a variações no desempenho produtivo, na eficiência alimentar e na resistência a doenças, sugerindo que a funcionalidade do microbioma pode representar um indicador mais robusto do estado fisiológico das aves do que a composição taxonômica isoladamente (Kers et al., 2018). Essa perspectiva tem impulsionado a busca por biomarcadores funcionais e por estratégias de modulação da microbiota com potencial aplicação nutricional e sanitária.

Em última análise, a integração entre dados funcionais, informações taxonômicas e variáveis ambientais amplia a capacidade de compreender como fatores externos, incluindo dieta, genética, manejo e uso de aditivos, influenciam a dinâmica do microbioma intestinal. Alterações nesses fatores podem modificar vias metabólicas predominantes e impactar diretamente o equilíbrio ecológico do TGI. Sob essa abordagem sistêmica, torna-se possível investigar não apenas quais microrganismos estão presentes, mas também como suas atividades contribuem para processos fisiológicos associados à saúde intestinal e ao desempenho produtivo. A metagenômica funcional

consolida-se, assim, como uma ferramenta central para a investigação de sistemas biológicos complexos, permitindo identificar processos metabólicos, interações ecológicas e potenciais alvos de intervenção voltados à otimização da saúde intestinal e à sustentabilidade da produção avícola.

2.4.3. Plasmídeos e elementos genéticos móveis

A plasticidade genética das comunidades microbianas está fortemente associada à presença de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis, responsáveis pela aquisição e disseminação de características adaptativas em escalas de tempo relativamente curtas, por meio do mecanismo de transferência horizontal de genes (do inglês, *horizontal gene transfer* ou HGT). No TGI de aves, a elevada densidade microbiana e a intensa interação entre diferentes espécies criam condições particularmente favoráveis para a circulação de material genético. Nesse ambiente, plasmídeos, transposons, integrons e bacteriófagos exercem papel importante na dinâmica evolutiva da microbiota intestinal, favorecendo a adaptação microbiana frente a mudanças ambientais, pressões seletivas e intervenções nutricionais ou terapêuticas (Frost et al., 2005; Smillie et al., 2010).

Entre esses componentes, os plasmídeos constituem um dos principais vetores de transferência genética entre bactérias. Essas moléculas de DNA extracromossômico, geralmente circulares e de replicação autônoma, frequentemente carregam genes associados à resistência a antimicrobianos, tolerância a condições ambientais adversas e metabolização de diferentes substratos. Sua disseminação ocorre principalmente por conjugação, mecanismo que envolve contato direto entre células bacterianas e permite a transferência de material genético entre diferentes microrganismos (Smillie et al., 2010).

De modo mais amplo, a transferência horizontal de genes constitui um dos principais mecanismos responsáveis pela circulação de material genético entre microrganismos não relacionados filogeneticamente. Esse processo ocorre principalmente por conjugação, transformação e transdução (Figura 8). A conjugação, mediada por plasmídeos conjugativos, representa uma das principais vias de disseminação de genes de resistência em ambientes intestinais. Na transformação, bactérias incorporam DNA livre presente no ambiente, enquanto na transdução a mobilização gênica é intermediada por bacteriófagos, que atuam como vetores de transferência entre células bacterianas (Frost et al., 2005). Em ecossistemas altamente densos e dinâmicos, como o TGI aviário, esses mecanismos exercem papel relevante na redistribuição de funções adaptativas entre diferentes populações microbianas.

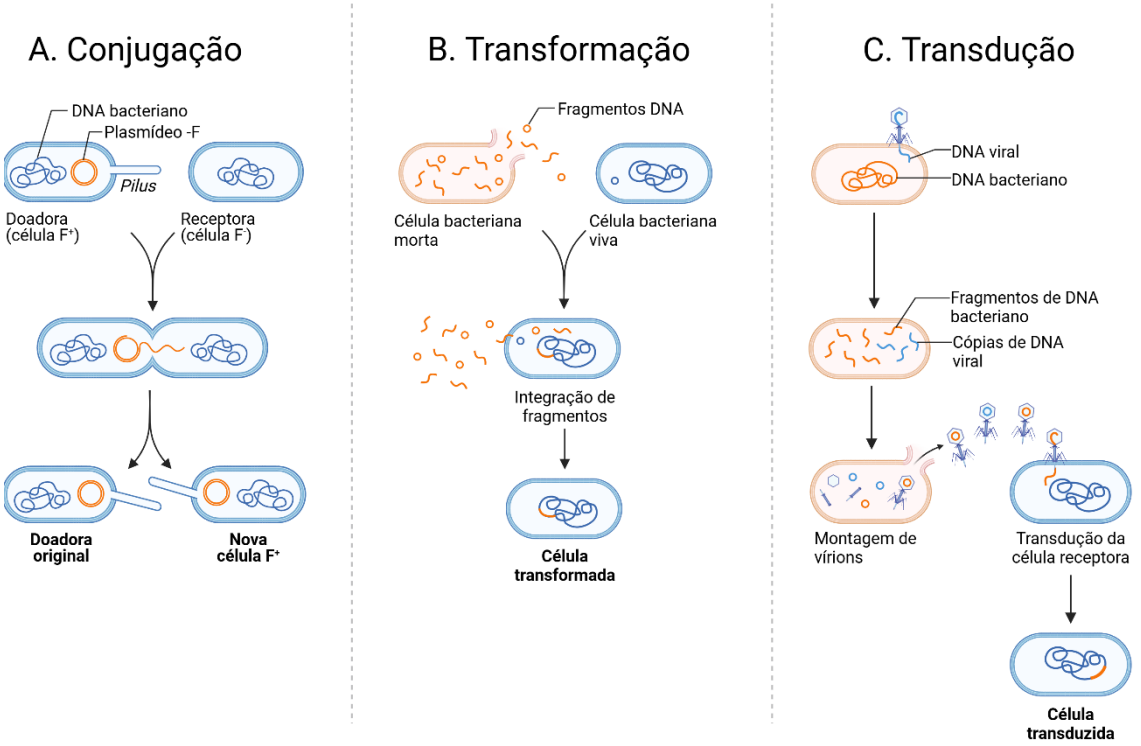


Figura 8. Principais mecanismos de transferência horizontal de genes em bactérias. Representação esquemática dos processos de conjugação (A), transformação (B) e transdução (C), envolvidos na transferência horizontal de material genético entre bactérias. Fonte: Elaboração própria utilizando BioRender.

Além dos plasmídeos, outros elementos móveis, como transposons, integrons e ilhas genômicas, também participam da reorganização e disseminação de genes entre genomas bacterianos. Integrons, por exemplo, possuem a capacidade de capturar e expressar cassetes gênicos frequentemente associados à resistência antimicrobiana, podendo estar localizados tanto em plasmídeos quanto em regiões cromossômicas associadas a transposons. Essa associação amplia significativamente o potencial de disseminação desses genes em diferentes contextos ambientais (Gillings, 2014).

No microbioma intestinal aviário, a abundância e diversidade de plasmídeos e outros componentes móveis frequentemente refletem pressões seletivas associadas ao uso de antimicrobianos, à dieta e às condições de manejo. A utilização histórica de antibióticos como promotores de crescimento exerceu forte pressão seletiva sobre as comunidades microbianas, favorecendo a disseminação de genes de resistência frequentemente associados a plasmídeos e outros sistemas de mobilidade genética

(Dibner & Richards, 2005; Van Boeckel et al., 2015). Mesmo após a restrição ou redução do uso desses compostos em diversos países, muitos desses genes permanecem estáveis nas populações bacterianas, evidenciando a persistência e capacidade de manutenção desses sistemas genéticos.

A aplicação de abordagens metagenômicas ampliou a capacidade de identificar estruturas associadas à mobilidade genética em comunidades microbianas complexas. A partir de dados de sequenciamento shotgun, é possível detectar sequências plasmidiais, sequências de inserção e outros elementos móveis, além de inferir potenciais redes de intercâmbio gênico entre microrganismos (Smillie et al., 2010; Quince et al., 2017). As sequências de inserção, os menores elementos transponíveis conhecidos, merecem destaque. Elas podem mobilizar genes adjacentes, inclusive genes de resistência, e interagem com plasmídeos conjugativos na disseminação desses determinantes entre bactérias (Partridge et al., 2018; Che et al., 2021). A reconstrução desses elementos em genomas montados a partir de metagenomas, no entanto, tem limitações importantes. A variabilidade estrutural e as regiões repetitivas dificultam a distinção entre sequências plasmidiais e cromossômicas, e os plasmídeos, por apresentarem cobertura e composição de nucleotídeos diferentes das do cromossomo, são frequentemente perdidos ou atribuídos ao genoma errado durante o agrupamento dos contigs. Por isso, genes de resistência associados a plasmídeos tendem a ser subestimados em análises baseadas em MAGs, especialmente quando derivadas de leituras curtas (Quince et al., 2017).

Do ponto de vista sanitário, a disseminação de genes mediada por plasmídeos e outros sistemas de mobilidade genética possui implicações relevantes para a saúde animal e humana, especialmente no contexto da resistência antimicrobiana. O TGI aviário pode atuar como reservatório de determinantes de resistência potencialmente transferíveis para microrganismos patogênicos, com possibilidade de disseminação ao longo da cadeia alimentar ou do ambiente (Marshall & Levy, 2011). Essa interconexão reforça a importância de estratégias de monitoramento alinhadas ao conceito de Saúde Única, integrando saúde animal, humana e ambiental no controle da resistência antimicrobiana.

Além da resistência a antimicrobianos, plasmídeos e outros elementos móveis frequentemente carregam genes relacionados à virulência, metabolismo e adaptação ambiental, ampliando o repertório funcional das comunidades microbianas (Partridge et al., 2018). A contínua aquisição e redistribuição dessas funções contribui para a formação de microbiomas altamente dinâmicos, capazes de responder rapidamente a alterações ambientais e pressões seletivas.

Compreender a dinâmica desses sistemas no microbioma intestinal aviário torna-se, portanto, essencial para elucidar os mecanismos envolvidos na adaptação e evolução das comunidades microbianas. A integração entre metagenômica, genômica comparativa e análise funcional amplia a capacidade de identificar padrões de mobilidade genética e sua relação com fatores ambientais e produtivos. Sob essa perspectiva, o estudo de plasmídeos e outros elementos móveis fornece bases importantes para o desenvolvimento de estratégias voltadas à redução da disseminação de resistência antimicrobiana e à promoção da estabilidade da microbiota intestinal em sistemas de produção avícola.

2.5.Resistência antimicrobiana e regulamentação do uso de antimicrobianos

2.5.1. Genes de resistência e virulência

A presença de genes de resistência a antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial resistance genes* ou ARGs) e fatores de virulência no microbioma intestinal aviário representa um dos principais pontos de interseção entre produção animal e saúde pública. Esses elementos refletem a capacidade adaptativa das comunidades microbianas frente a pressões seletivas e influenciam diretamente o potencial patogênico de determinados microrganismos. A análise integrada desses componentes permite compreender os mecanismos envolvidos na persistência, seleção e disseminação de características associadas à sobrevivência bacteriana e à infecção em ambientes complexos, como o TGI.

Mecanisticamente, os genes de resistência a antimicrobianos codificam diferentes enzimas capazes de reduzir ou impedir a ação de compostos antibióticos. Entre os mecanismos mais frequentemente descritos destacam-se a inativação enzimática do fármaco, a alteração do sítio-alvo, a redução da permeabilidade celular e a ativação de sistemas de efluxo. Genes do grupo *bla*, associados à produção de β-lactamases, conferem resistência a antibióticos β-lactâmicos; genes *tet* estão relacionados à resistência a tetraciclinas; enquanto genes *erm* participam da modificação de alvos ribossomais, reduzindo a eficácia de macrolídeos e compostos relacionados (Roberts, 2005; Wright, 2007). A diversidade desses determinantes genéticos evidencia a complexidade funcional do resistoma presente no ambiente intestinal.

Nem todo gene de resistência detectado em um genoma tem a mesma relevância epidemiológica. Parte desses determinantes é intrínseca, ou seja, faz parte do cromossomo de uma espécie ou grupo bacteriano e não está associada a elementos móveis. É o caso de algumas β-lactamases cromossômicas e de sistemas de efluxo característicos de determinadas famílias. Outra parte é adquirida, geralmente por transferência horizontal,

e é sobretudo essa fração que permite a disseminação da resistência entre bactérias comensais e patogênicas (Partridge et al., 2018; Crits-Christoph et al., 2022). A detecção desses genes em dados genômicos e metagenômicos também exige cautela metodológica. Ferramentas como o AMRFinderPlus comparam as sequências preditas com bancos curados de proteínas de resistência, mas também identificam homólogos distantes por meio de modelos de famílias proteicas (Feldgarden et al., 2021). Esses homólogos indicam semelhança com uma família de proteínas associada à resistência, e não necessariamente a presença de um gene funcional de resistência. Distinguir genes adquiridos, determinantes intrínsecos e homólogos distantes é, portanto, essencial para não superestimar a carga de resistência de uma comunidade.

Entre os genes adquiridos, alguns merecem atenção especial por conferirem resistência a antimicrobianos considerados criticamente importantes para a medicina humana (WHO, 2017). Destacam-se os genes *mcr*, que conferem resistência à colistina, um antimicrobiano de último recurso, e que foram descritos pela primeira vez em plasmídeos de *Escherichia coli* de origem animal (Liu et al., 2016). Também são relevantes as β-lactamases de espectro estendido, como as do tipo CTX-M, e as carbapenemases, que comprometem a eficácia de cefalosporinas de terceira geração e de carbapenêmicos. O mesmo vale para os genes *optrA*, *poxtA* e *cfr*, que conferem resistência às oxazolidinonas, como a linezolida, e são cada vez mais relatados em animais de produção (Schwarz et al., 2021). Completam o grupo as variantes *tet(X)*, que inativam a tigeciclina e foram descritas em plasmídeos de origem animal e humana (He et al., 2019), e o operon *vanA*, responsável pela resistência a glicopeptídeos e que persiste em ambientes avícolas anos após a proibição da avoparcina (Sørum et al., 2006). Na avicultura, a resistência pode ainda ser selecionada por compostos de uso veterinário específico, como os ionóforos anticoccidianos, para os quais foram descritos genes de resistência, como o operon *narAB* (Naemi et al., 2020).

A disseminação desses genes encontra-se intimamente associada à transferência horizontal de material genético, cujos mecanismos de conjugação, transformação e transdução foram descritos na seção 2.4.3 (Figura 10), sendo frequentemente mediada por plasmídeos, transposons e integrons. Esses sistemas de mobilidade permitem o compartilhamento de determinantes de resistência entre diferentes espécies bacterianas, incluindo microrganismos comensais e patogênicos de relevância clínica (Figura 9). No TGI aviário, caracterizado por elevada densidade microbiana e intensa interação entre populações bacterianas, as condições tornam-se particularmente favoráveis à circulação

desses genes e à ampliação de seu potencial de disseminação ao longo da cadeia produtiva e alimentar (Frost et al., 2005; Gillings, 2014). Essa dinâmica reforça o papel do microbioma intestinal como importante reservatório de resistência antimicrobiana.

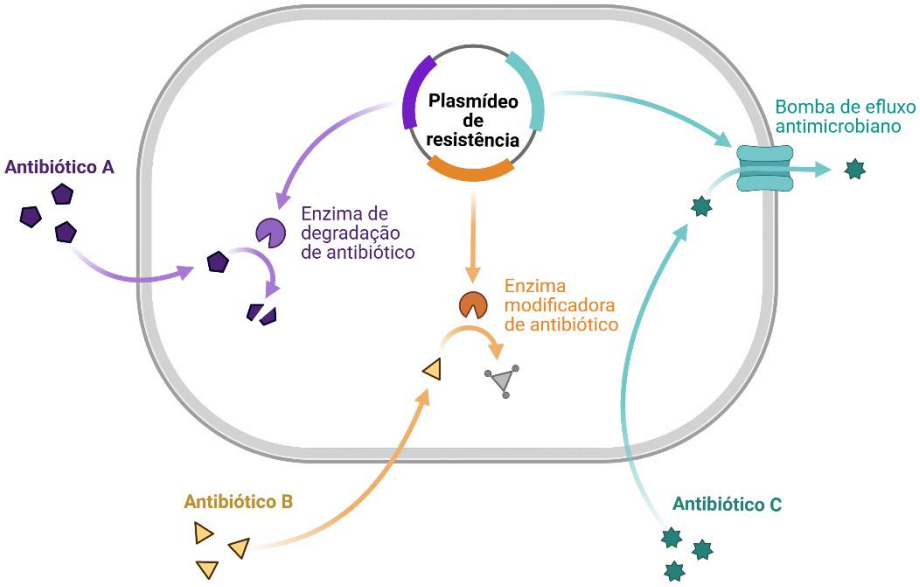


Figura 9. Principais mecanismos bacterianos associados à resistência a antimicrobianos. Esquema representando mecanismos de resistência bacteriana, incluindo degradação enzimática de antibióticos, modificação molecular do fármaco e bombeamento de efluxo mediado por plasmídeos de resistência. Fonte: Elaboração própria utilizando BioRender.

Historicamente, a utilização de antibióticos como promotores de crescimento na avicultura exerceu forte pressão seletiva sobre essas comunidades microbianas, contribuindo para a manutenção e disseminação de genes associados à resistência. Embora a restrição desse uso em diversos países tenha reduzido parte dessa pressão, estudos demonstram que muitos desses determinantes permanecem estáveis nas populações bacterianas mesmo na ausência de exposição direta aos antimicrobianos (Dibner & Richards, 2005; Van Boeckel et al., 2015). Essa persistência pode estar relacionada tanto à estabilidade de elementos genéticos móveis quanto à co-seleção de genes envolvidos em outras funções adaptativas.

Paralelamente à resistência antimicrobiana, o potencial patogênico das comunidades microbianas intestinais também está associado à presença de fatores de virulência. Esses determinantes genéticos conferem aos microrganismos a capacidade de colonizar o hospedeiro, invadir tecidos, modular respostas imunes e causar danos celulares. Entre os principais mecanismos envolvidos destacam-se adesinas, invasinas, toxinas, sistemas de secreção e estratégias de aquisição de nutrientes, incluindo sistemas de captação de ferro (Finlay & Falkow, 1997).

Na avicultura, patógenos como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* patogênica aviária (do inglês, *Avian Pathogenic Escherichia coli* ou APEC) representam importantes modelos para o estudo desses fatores devido ao impacto que exercem sobre a saúde animal e ao seu potencial zoonótico. Em *Salmonella*, genes localizados em ilhas de patogenicidade (do inglês, *Salmonella Pathogenicity Islands* ou SPI) participam de processos relacionados à invasão celular e à sobrevivência intracelular, desempenhando papel central no estabelecimento da infecção (Marcus et al., 2000). Já em cepas patogênicas de *E. coli*, estruturas como fímbrias, toxinas e sistemas de aquisição de ferro contribuem para a colonização, persistência e disseminação no hospedeiro (Kaper et al., 2004).

O desenvolvimento de abordagens metagenômicas ampliou significativamente a capacidade de detectar genes de resistência e fatores de virulência em comunidades microbianas complexas. Diferentemente de métodos dependentes do isolamento e cultivo de microrganismos, a análise direta do DNA total das amostras permite identificar um amplo repertório genético presente no microbioma intestinal, incluindo determinantes que frequentemente permanecem não detectados por abordagens convencionais. Essa estratégia possibilita caracterizar, de maneira integrada, o resistoma e o viruloma das comunidades microbianas, fornecendo uma visão mais abrangente de seu potencial funcional (Quince et al., 2017). Estudos baseados nessa abordagem demonstram que mesmo microbiotas consideradas estáveis ou aparentemente saudáveis podem atuar como reservatórios de genes associados à resistência antimicrobiana e à virulência.

Particular preocupação recai sobre a coexistência de genes de resistência e fatores de virulência em um mesmo microrganismo ou elemento genético móvel. Essa associação pode favorecer processos de co-seleção, nos quais características relacionadas tanto à sobrevivência quanto ao potencial patogênico são selecionadas simultaneamente. A ocorrência desses mecanismos evidencia a complexidade das interações evolutivas presentes no microbioma intestinal e reforça a necessidade de abordagens integrativas

para compreender como práticas de manejo, uso de antimicrobianos e pressões ambientais influenciam a dinâmica dessas comunidades.

Em sistemas de produção avícola, o TGI das aves pode atuar como importante ponto de conexão entre diferentes compartimentos ecológicos, favorecendo a circulação de genes de resistência e fatores de virulência entre ambientes microbianos distintos. A possibilidade de disseminação desses determinantes ao longo da cadeia alimentar, bem como por vias ambientais, reforça a necessidade de estratégias integradas de monitoramento e mitigação alinhadas ao conceito de Saúde Única, que reconhece a interdependência entre saúde animal, humana e ambiental (Marshall & Levy, 2011).

Em síntese, a investigação integrada de resistoma e viruloma fornece informações relevantes sobre o potencial funcional do microbioma intestinal e sobre os riscos associados à produção avícola. A incorporação de dados taxonômicos, funcionais e ambientais amplia a capacidade de interpretar a dinâmica dessas comunidades microbianas e favorece o desenvolvimento de estratégias voltadas à redução da pressão seletiva e da disseminação de genes de resistência. Medidas como uso racional de antimicrobianos, adoção de boas práticas de manejo e utilização de alternativas nutricionais, incluindo probióticos e prebióticos, têm sido propostas como abordagens promissoras nesse contexto.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana e na virulência microbiana representa, portanto, um passo importante para o desenvolvimento de sistemas produtivos mais seguros e sustentáveis. Nesse cenário, o avanço das ferramentas metagenômicas e bioinformáticas tende a ampliar a capacidade de identificar padrões ecológicos e funcionais associados ao microbioma intestinal, contribuindo para intervenções mais direcionadas e para o aprimoramento das estratégias de controle em produção animal.

2.5.2. Legislação sobre uso de antibióticos

O uso de antimicrobianos na produção animal, especialmente como promotores de crescimento, tem recebido crescente atenção da comunidade científica e de órgãos regulatórios devido à sua associação com a emergência e disseminação da resistência antimicrobiana. Na avicultura, essa discussão assume particular relevância em razão da escala global da produção intensiva e do potencial das aves atuarem como reservatórios de microrganismos resistentes. Como consequência, diferentes regiões do mundo passaram a implementar políticas voltadas à restrição e ao monitoramento do uso desses

compostos, refletindo a convergência entre evidências científicas, demandas sanitárias e pressões econômicas e sociais.

Pioneiramente, a União Europeia (UE) destacou-se nesse processo ao estabelecer, de forma progressiva, restrições ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, culminando na proibição total dessa prática em 2006 por meio do Regulamento (EC) nº 1831/2003. A decisão foi fundamentada em evidências que associavam o uso subterapêutico de antibióticos à seleção de bactérias resistentes com potencial impacto sobre a saúde humana (Castanon, 2007). Posteriormente, medidas adicionais ampliaram o controle sobre o uso profilático e reforçaram a exigência de prescrição veterinária para tratamentos terapêuticos (*European Medicines Agency*, 2017).

Nos Estados Unidos, por sua vez, as mudanças regulatórias ocorreram de maneira mais gradual, refletindo a complexidade do sistema produtivo e a relevância econômica da agropecuária. A implementação da *Guidance for Industry* #213 pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 2017, representou um marco importante ao restringir o uso de antimicrobianos de importância médica como promotores de crescimento e estabelecer supervisão veterinária obrigatória para sua utilização em animais destinados à produção de alimentos (FDA, 2017).

Já a China, um dos maiores produtores mundiais de proteína animal, também passou a adotar medidas mais restritivas diante das preocupações relacionadas à resistência antimicrobiana. Nos últimos anos, o país implementou políticas voltadas à proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento em rações animais e ao fortalecimento de programas de monitoramento do uso de antimicrobianos, refletindo crescente alinhamento com estratégias internacionais de contenção da resistência (Tang et al., 2020).

No Brasil, a regulamentação do uso de antimicrobianos na produção animal evoluiu progressivamente, com medidas que restringem o uso de determinados compostos como promotores de crescimento, em especial daqueles considerados importantes para a medicina humana. Um marco relevante foi a proibição do uso da colistina como aditivo melhorador de desempenho, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2016, pouco depois da descrição do gene *mcr-1* (MAPA, 2016). Posteriormente, foi proibido também o uso de tilosina, lincomicina e tiamulina com essa finalidade (MAPA, 2020). Medidas semelhantes foram adotadas em outros grandes produtores, como a China, que proibiu a colistina como promotor de crescimento em 2017, o que se traduziu em redução significativa da

resistência à colistina e da prevalência de *mcr-1* em animais e humanos (Wang et al., 2020). Além disso, iniciativas voltadas à rastreabilidade e ao monitoramento do uso de antimicrobianos têm sido implementadas no país, embora ainda existam desafios relacionados à padronização e à fiscalização.

No plano internacional, organizações como a *World Health Organization* (WHO) e a *World Organisation for Animal Health* (WOAH, anteriormente OIE) têm desempenhado papel central na formulação de diretrizes globais para o uso prudente de antimicrobianos em animais. A WHO, por exemplo, publicou listas de antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana, recomendando a restrição de seu uso em animais destinados à produção de alimentos (WHO, 2017). Essas diretrizes têm influenciado políticas nacionais e incentivado a adoção de práticas mais sustentáveis na produção animal.

Do ponto de vista prático, a implementação dessas regulamentações tem impactos diretos sobre os sistemas de produção avícola. A restrição ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento tem impulsionado a busca por alternativas que permitam manter a eficiência produtiva sem comprometer a saúde animal. Nesse contexto, estratégias como o uso de probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e aditivos fitogênicos têm ganhado destaque, conforme discutido anteriormente (Gadde et al., 2017). Além disso, melhorias nas práticas de manejo, biosseguridade e nutrição têm sido fundamentais para compensar a retirada dos antimicrobianos.

Do ponto de vista microbiológico, a redução do uso de antimicrobianos pode influenciar a composição e a estabilidade da microbiota intestinal, contribuindo para a diminuição da pressão seletiva que favorece a disseminação de genes de resistência. No entanto, os efeitos dessas mudanças podem variar dependendo das condições específicas de cada sistema produtivo, sendo necessários estudos contínuos para avaliar seus impactos a longo prazo.

A harmonização das políticas de uso de antimicrobianos entre diferentes países representa, ainda, um desafio adicional, especialmente em um mercado globalizado. Diferenças nas regulamentações podem influenciar a competitividade entre países e criar barreiras comerciais, particularmente em relação a padrões sanitários e exigências de importação. Nesse cenário, iniciativas internacionais que promovam a convergência regulatória são fundamentais para garantir a segurança alimentar e a sustentabilidade da produção.

A discussão sobre o uso de antimicrobianos na avicultura está, assim, intrinsecamente ligada ao conceito de Saúde Única, que reconhece a interdependência entre saúde humana, animal e ambiental. A implementação de políticas eficazes requer uma abordagem integrada, envolvendo múltiplos setores e disciplinas, bem como o engajamento de produtores, pesquisadores e autoridades regulatórias.

Em síntese, a evolução das regulamentações sobre o uso de antimicrobianos na produção avícola reflete um esforço global para equilibrar eficiência produtiva e responsabilidade sanitária. A compreensão dessas políticas e de seus impactos é essencial para contextualizar os desafios e oportunidades associados ao manejo da microbiota intestinal e ao controle da resistência antimicrobiana em sistemas de produção animal.

2.6. Aplicações biotecnológicas e estratégias alternativas

2.6.1. Sistema CRISPR-Cas em bactérias intestinais

Os sistemas CRISPR-Cas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* associados a proteínas Cas) representam um dos principais mecanismos de defesa adaptativa em bactérias e arqueias, atuando na proteção contra elementos genéticos invasores, como bacteriófagos e plasmídeos. No contexto do microbioma intestinal, esses sistemas desempenham papel relevante na regulação da aquisição de material genético, influenciando a dinâmica evolutiva das comunidades microbianas e sua capacidade de adaptação a diferentes pressões ambientais.

Estruturalmente, a organização desses sistemas inclui um *locus* CRISPR, composto por repetições curtas intercaladas por sequências espaçadoras, e genes *cas*, responsáveis pela codificação das proteínas envolvidas nos processos de defesa. Os espaçadores derivam de fragmentos de DNA de elementos previamente encontrados, funcionando como registros moleculares que permitem o reconhecimento de sequências invasoras em exposições subsequentes (Barrangou et al., 2007; Marraffini, 2015). Esse mecanismo confere às bactérias uma forma de imunidade adaptativa baseada em memória genética.

O funcionamento do sistema envolve três etapas principais. Durante a fase de adaptação, fragmentos de DNA exógeno são incorporados ao *locus* CRISPR como novos espaçadores. Na etapa seguinte, esses espaçadores são transcritos e processados em RNAs guia, que direcionam as proteínas Cas para sequências complementares. Por fim, a fase de interferência consiste no reconhecimento e clivagem do DNA invasor, impedindo sua

replicação e propagação (Hille et al., 2018). Esse processo permite uma resposta altamente específica a elementos genéticos previamente encontrados.

Do ponto de vista evolutivo, a diversidade dos sistemas CRISPR-Cas reflete a variedade de estratégias adotadas pelos microrganismos. Esses sistemas são classificados em diferentes classes e tipos, com base em suas características estruturais e funcionais. Sistemas de Classe 1 utilizam complexos multiproteicos para a detecção e clivagem do DNA-alvo, enquanto sistemas de Classe 2 dependem de uma única proteína efetora, como a amplamente estudada Cas9 (Makarova et al., 2020). Essa diversidade amplia a capacidade dos microrganismos de responder a diferentes pressões seletivas.

No ambiente intestinal, a presença de sistemas CRISPR-Cas está associada à interação contínua entre bactérias, bacteriófagos e elementos genéticos móveis. Por limitar a entrada de DNA exógeno, esses sistemas poderiam, em princípio, restringir a aquisição de genes de resistência e de virulência. Essa relação, no entanto, não é simples. Análises comparativas em diversas espécies bacterianas não encontraram associação consistente entre a atividade dos sistemas CRISPR-Cas e as taxas de aquisição de genes ao longo da evolução (Gophna et al., 2015). Estudos experimentais mostraram ainda que, em certas condições, a imunidade mediada por CRISPR pode até favorecer a transferência de genes por transdução, ao proteger as células receptoras da lise por fagos (Watson et al., 2018). Assim, o papel desses sistemas na dinâmica de genes de resistência no intestino permanece em aberto, e sua presença deve ser interpretada como um registro das interações com elementos invasores, e não necessariamente como uma barreira à transferência horizontal.

Nesse sentido, a análise metagenômica tem permitido identificar a presença e a diversidade de sistemas CRISPR-Cas em microbiomas intestinais, incluindo aqueles associados a aves. A caracterização dos espaçadores presentes nesses sistemas fornece informações sobre interações passadas com bacteriófagos e plasmídeos, permitindo inferir padrões de exposição a elementos genéticos invasores. Essa abordagem oferece uma perspectiva adicional para o estudo das relações ecológicas dentro das comunidades microbianas (Shmakov et al., 2017).

Em síntese, a investigação dos sistemas CRISPR-Cas no microbioma intestinal de aves amplia a compreensão das interações entre bactérias, bacteriófagos e elementos genéticos móveis. A análise de seus espaçadores permite inferir quais elementos invasores circulam nessas comunidades e quais linhagens bacterianas estão mais expostas a eles. Além disso, o conhecimento sobre a diversidade natural desses sistemas fornece base para

aplicações biotecnológicas futuras, como o uso de sistemas CRISPR como antimicrobianos programáveis, capazes de eliminar seletivamente patógenos ou genes de resistência (Bikard & Barrangou, 2017).

2.6.2. Potencial probiótico e alternativas a antibióticos

A crescente restrição ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção avícola tem impulsionado a busca por estratégias alternativas que permitam manter a eficiência produtiva e a saúde dos animais sem contribuir para a disseminação da resistência antimicrobiana. Nesse contexto, a modulação da microbiota intestinal por meio de aditivos funcionais tem emergido como abordagem promissora, destacando-se o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos. Essas estratégias baseiam-se na promoção de um ambiente intestinal equilibrado, capaz de favorecer microrganismos benéficos e inibir a colonização por patógenos.

Por definição, probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Na avicultura, espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* são amplamente utilizadas, sendo selecionadas com base em características como resistência às condições do TGI, capacidade de adesão à mucosa intestinal e produção de substâncias antimicrobianas. Esses microrganismos podem atuar por diferentes mecanismos, incluindo exclusão competitiva de patógenos, produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas, modulação do sistema imunológico e reforço da barreira intestinal (Gadde et al., 2017) (Figura 10).

A exclusão competitiva constitui um dos principais mecanismos de ação dos probióticos, no qual microrganismos benéficos competem com patógenos por sítios de adesão e nutrientes, reduzindo a probabilidade de colonização por agentes como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Além disso, a produção de metabólitos como ácido lático e AGCC contribui para a redução do pH intestinal, criando um ambiente desfavorável ao crescimento de microrganismos patogênicos (Apajalahti & Vienola, 2016).

Entre os mecanismos de ação dos probióticos, a produção de bacteriocinas tem recebido atenção especial. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos, geralmente ativos contra bactérias relacionadas à linhagem produtora, e que podem atuar como uma forma de imunidade inata da comunidade bacteriana (Cotter et al., 2005). Elas formam um grupo estruturalmente diverso, que inclui lantipeptídeos,

bacteriocinas de classe II, típicas de bactérias láticas, e colicinas e microcinas, produzidas por enterobactérias. Na avicultura, bacteriocinas de bactérias láticas têm sido propostas como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento, com atividade descrita contra patógenos como *Campylobacter* e *Clostridium perfringens* (Vieco-Saiz et al., 2019). Já as microcinas produzidas por cepas comensais de *E. coli* podem limitar a expansão de outras enterobactérias, incluindo *Salmonella*, no intestino inflamado (Cascales et al., 2007; Sassone-Corsi et al., 2016). A disponibilidade de genomas permite hoje a busca sistemática por agrupamentos gênicos de bacteriocinas com ferramentas dedicadas (van Heel et al., 2018), o que amplia a identificação de linhagens produtoras para além das já cultivadas.

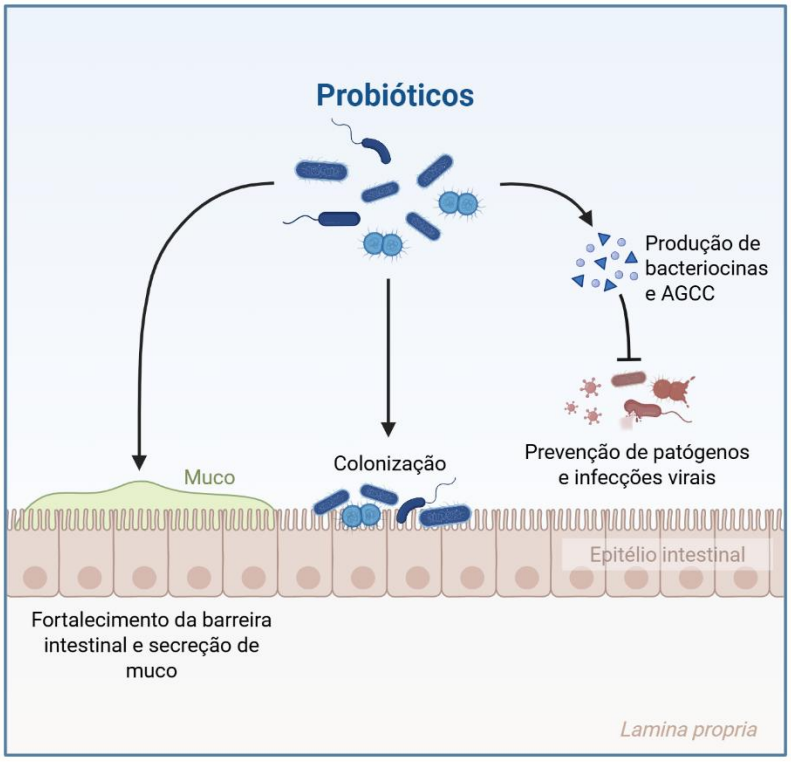


Figura 10. Mecanismos de ação de probióticos no epitélio intestinal. Representação esquemática dos efeitos dos probióticos sobre o ambiente intestinal, incluindo colonização microbiana, produção de bacteriocinas e ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), inibição de patógenos e fortalecimento da barreira epitelial. Fonte: Elaboração própria utilizando BioRender.

Já os prebióticos são definidos como substratos seletivamente utilizados por microrganismos do hospedeiro que conferem benefícios à saúde. Compostos como frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), inulina e mananoligossacarídeos (MOS) não são digeridos pelas enzimas do hospedeiro, sendo fermentados pela microbiota intestinal, o que resulta na produção de metabólitos benéficos e na estimulação do crescimento de bactérias comensais (Gibson & Roberfroid, 1995; Gibson et al., 2017). Esses compostos têm sido associados à melhoria da integridade intestinal, à modulação da resposta imune e à redução da carga de patógenos.

Os simbióticos, por sua vez, combinam probióticos e prebióticos em uma mesma formulação, com o objetivo de potencializar seus efeitos sinérgicos. Essa abordagem busca fornecer simultaneamente microrganismos benéficos e os substratos necessários para sua proliferação, favorecendo a colonização e a estabilidade dessas populações no TGI. Estudos indicam que simbióticos podem apresentar efeitos superiores aos obtidos com a utilização isolada de probióticos ou prebióticos, especialmente em condições de desafio sanitário (Gadde et al., 2017).

Além dessas categorias, outros aditivos têm sido explorados como alternativas aos antibióticos, incluindo ácidos orgânicos, fitogênicos e enzimas exógenas. Ácidos orgânicos, como ácido fórmico, acético e butírico, podem atuar na redução do pH intestinal e na inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Compostos fitogênicos, derivados de plantas, apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, podendo contribuir para a modulação da microbiota e para a melhoria do desempenho produtivo (Windisch et al., 2008).

A eficácia dessas estratégias está diretamente relacionada à capacidade de influenciar a composição e a funcionalidade da microbiota intestinal. Estudos têm demonstrado que a suplementação com probióticos e prebióticos pode resultar em aumento da abundância de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e redução de microrganismos potencialmente patogênicos, contribuindo para a estabilidade do ecossistema intestinal (Oakley et al., 2014). Além disso, essas intervenções podem impactar positivamente parâmetros produtivos, como ganho de peso, conversão alimentar e qualidade de carcaça.

A segurança dos microrganismos utilizados como probióticos é igualmente importante. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) adota o conceito de presunção qualificada de segurança, que condiciona o uso de uma linhagem em alimentos e rações à ausência de resistência adquirida a antimicrobianos clinicamente

relevantes e, em alguns grupos, à ausência de fatores de virulência (EFSA BIOHAZ Panel, 2023). Esse cuidado se justifica porque genes de resistência adquiridos, como *tet(W)* e *erm(B)*, já foram descritos em bactérias láticas e bifidobactérias, inclusive em cepas comerciais (Ammor et al., 2007), e porque essas bactérias poderiam atuar como vetores desses genes no intestino. O gênero *Enterococcus*, embora utilizado como probiótico, permanece controverso pela frequente presença de fatores de virulência e de resistência. Paralelamente, gêneros comensais como *Faecalibacterium* e *Akkermansia* têm sido propostos como probióticos de nova geração, com benefícios associados à produção de butirato e ao reforço da barreira intestinal (Miquel et al., 2013). A análise genômica permite avaliar simultaneamente o potencial benéfico e os riscos de candidatos a probióticos. Ainda assim, ela constitui apenas uma primeira etapa: a validação de uma linhagem probiótica exige isolamento em cultura pura, confirmação fenotípica de suas características e ensaios *in vivo* (Merenstein et al., 2023).

A interação entre esses aditivos e o sistema imunológico também tem sido amplamente investigada. A modulação da microbiota intestinal pode influenciar a produção de citocinas, a ativação de células imunes e a integridade da barreira epitelial, contribuindo para uma resposta imune mais eficiente e equilibrada. Esse efeito é particularmente relevante em sistemas de produção intensiva, nos quais as aves estão frequentemente expostas a desafios sanitários.

Nesse cenário, avanços recentes na metagenômica têm permitido uma compreensão mais detalhada dos efeitos desses aditivos sobre o microbioma intestinal, possibilitando a identificação de alterações em vias metabólicas específicas e a associação dessas mudanças com melhorias no desempenho produtivo. Essa abordagem tem contribuído para o desenvolvimento de estratégias mais direcionadas, baseadas na modulação funcional da microbiota, em vez de intervenções generalistas.

Apesar dos benefícios observados, a variabilidade nos resultados entre diferentes estudos indica que a eficácia dessas estratégias pode ser influenciada por fatores como composição da dieta, linhagem das aves, condições de manejo e características específicas dos aditivos utilizados. A seleção e aplicação dessas intervenções devem, portanto, ser realizadas de maneira criteriosa, considerando as particularidades de cada sistema produtivo.

Em síntese, o desenvolvimento de alternativas aos antibióticos representa um dos principais desafios e oportunidades da avicultura contemporânea. A integração de conhecimentos sobre microbiota, nutrição e imunologia, aliada ao uso de ferramentas

ômicas, tem potencial para transformar a forma como a saúde intestinal é manejada em sistemas de produção animal. Nesse contexto, a modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e outras estratégias representa uma abordagem promissora para promover sistemas produtivos mais sustentáveis, seguros e alinhados às demandas globais.

3. Hipótese, objetivos e perguntas científicas

3.1. Hipótese

A integração de dados metagenômicos públicos, provenientes de diferentes regiões geográficas, linhagens e sistemas de produção, permite reconstruir um catálogo de genomas da microbiota gastrointestinal de aves comerciais (*Gallus gallus domesticus*) no qual: (i) a arquitetura funcional da comunidade é conservada entre contextos de produção, apesar da variação taxonômica entre estudos; e (ii) os determinantes genômicos associados a risco (genes de resistência adquiridos, elementos genéticos móveis e fatores de virulência) concentram-se em linhagens específicas, enquanto traços competitivos e defensivos (bacteriocinas e sistemas CRISPR-Cas) distribuem-se de forma ampla. Isso possibilita a priorização genômica de candidatos com potencial probiótico.

3.2. Objetivo geral

Construir e caracterizar um catálogo de genomas montados a partir de metagenomas (MAGs) da microbiota gastrointestinal de aves comerciais, integrando dados públicos de diferentes contextos de produção, e anotá-lo quanto à taxonomia, ao potencial metabólico, ao resistoma, ao mobiloma, aos fatores de virulência, aos sistemas CRISPR-Cas, à produção de bacteriocinas e ao potencial probiótico, de modo a constituir um recurso de referência para a microbiota aviária.

3.3. Objetivos específicos

a) Selecionar estudos metagenômicos públicos do trato gastrointestinal de aves comerciais, reconstruir MAGs a partir das leituras brutas disponíveis e integrá-los aos MAGs já publicados, aplicando critérios uniformes de qualidade;

b) Classificar taxonomicamente os MAGs e descrever a diversidade da comunidade e sua variação entre *BioProjects*, segmentos intestinais e linhagens;
c) Caracterizar o potencial funcional do catálogo (categorias COG, enzimas ativas em carboidratos e completude de vias metabólicas de fermentação, aminoácidos e vitaminas);
d) Identificar genes de resistência a antimicrobianos, distinguindo determinantes adquiridos de intrínsecos, com ênfase em genes de importância crítica para a saúde humana e animal;
e) Estimar o potencial de transferência horizontal de genes por meio da detecção de plasmídeos e sequências de inserção, e avaliar sua associação com genes de resistência adquiridos;
f) Identificar fatores de virulência e sua distribuição taxonômica;
g) Identificar e classificar sistemas CRISPR-Cas e os alvos virais de seus espaçadores;
h) Predizer agrupamentos gênicos biossintéticos de bacteriocinas;
i) Realizar a triagem genômica de candidatos probióticos com base em critérios taxonômicos e de segurança (ausência de resistência adquirida relevante e de fatores de virulência).

CAPÍTULO 2 – An integrated genome catalogue of the chicken gut microbiome links acquired antimicrobial resistance, mobility and probiotic potential

ABSTRACT

The chicken gastrointestinal microbiome contributes to nutrient conversion and host health, but it is also a reservoir of antimicrobial resistance and a source of potential alternatives to antimicrobials. Genome-resolved studies of this ecosystem have largely been restricted to single datasets, which limits the identification of general patterns. Here, we integrated raw metagenomic data and public metagenome-assembled genomes (MAGs) from six independent studies conducted in five countries into a uniformly quality-filtered catalogue of 11,224 MAGs (completeness ≥85%, contamination ≤10%). The catalogue encompassed 26 phyla, 829 genera and 1,977 species, 45.7% of which lacked a formal description. Taxonomic composition varied widely among studies, and more than half of all genera were recovered from a single dataset, whereas broad functional categories remained stable across production contexts. After separating curated resistance genes from low-identity homologues, acquired resistance genes were detected in 13.7% of MAGs, and 3.9% carried genes from three or more resistance classes. These genes were concentrated in commensal genera such as *Ligilactobacillus*, *Bacteroides* and *Faecalibacterium*, and were strongly associated with insertion sequences (odds ratio = 4.17). Genes of critical clinical relevance were rare (0.68% of MAGs) but present in five of the six datasets. They included *optrA*, *poxtA*, *cfr*, *tet(X)*, a complete *vanA* operon, *mecA*, *blaCTX-M-14* and *qnr* genes, and the poultry pathogen *Enterococcus cecorum* carried the highest multidrug-resistance burden. No *mcr* gene or acquired carbapenemase was detected, a result that likely reflects, at least in part, the loss of plasmids during genome binning. Virulence factors were restricted to 4.6% of MAGs, mainly Pseudomonadota and Campylobacterota. CRISPR-Cas systems were found in 23.6% of MAGs, and bacteriocin gene clusters in 14.8%. In a genomic probiotic screen, 210 of the 1,379 MAGs from probiotic genera were excluded for carrying acquired resistance genes. Bacteriocin potential was more frequent among excluded MAGs (41.0%) than among retained candidates (17.1%), revealing a trade-off between safety and competitive potential. This catalogue provides a genome-resolved reference for resistance surveillance and for the rational selection of microbiome-based interventions in poultry production.

Keywords: antimicrobial resistance; bacteriocins; metagenome-assembled genomes; mobile genetic elements; poultry gut microbiome; probiotics

Introduction

The gastrointestinal microbiome of commercial poultry operates as a metabolically active extension of the host digestive system. It converts dietary substrates that escape endogenous digestion into short-chain fatty acids, amino acids and vitamins, and contributes to immune development, epithelial integrity and resistance to enteric pathogens (Józefiak *et al*., 2004; Flint *et al*., 2012; Clavijo & Flórez, 2018). In intensive production systems, these functions have been linked to outcomes of direct economic relevance, such as feed conversion efficiency, growth performance and enteric disease. This has made the gut microbiome a target for interventions aimed at improving productivity while reducing reliance on antimicrobials (Stanley *et al*., 2014; Kogut & Arsenault, 2016).

The same microbial community also plays a less favourable role. For decades, the intensification of broiler and layer production was accompanied by the use of antimicrobials for growth promotion, prophylaxis and therapy. The progressive restriction of antibiotic growth promoters in several jurisdictions reflects mounting evidence that such use selects for resistant bacteria that can spread from animal production to clinical settings (Sana *et al*., 2025). Within this One Health context, the chicken gut microbiome is increasingly viewed both as a reservoir of antimicrobial resistance and as a source of sustainable alternatives to antimicrobials. Resistance genes in gut communities are not uniformly distributed across taxa, and their movement between commensal and pathogenic lineages depends largely on plasmids, transposons and other mobile genetic elements (Crits-Christoph *et al*., 2022). At the same time, resident bacteria resist colonisation by incoming pathogens through competition for nutrients and niches, through antimicrobial peptides such as bacteriocins, and, at the level of individual genomes, through CRISPR-Cas systems that target the bacteriophages and mobile elements that mediate gene transfer (Pickard *et al*., 2017). Resistance, mobility, virulence, defence and competitive inhibition are therefore interconnected properties of the same community, and characterising any one of them in isolation risks an incomplete picture of its potential risks and benefits.

Genome-resolved metagenomics has made it possible to examine these properties with unprecedented resolution. Unlike amplicon-based surveys, the reconstruction of metagenome-assembled genomes (MAGs) from shotgun sequencing data allows metabolic, resistance, mobility and virulence traits to be assigned directly to the

organisms that carry them, including the many lineages that lack cultured representatives (Gilroy *et al*., 2021). Large genome-resolved catalogues of the chicken gut have already revealed extensive taxonomic novelty and characterised the chicken gut resistome (Feng *et al*., 2021; Segura-Wang *et al*., 2021; Gilroy *et al*., 2021). These efforts, however, have been anchored almost entirely to single studies, single regions or narrow sets of production conditions. As a result, it remains unclear which taxonomic and functional features are general properties of the chicken gut microbiome and which reflect a particular host lineage, management regime or sequencing strategy. A recent multi-kingdom catalogue explicitly identified the integration of datasets from multiple origins, breeds, feeding systems and geographical contexts as a remaining gap in the field (Wang *et al*., 2024). Evidence from other host-associated microbiomes further suggests that taxonomically distinct communities can maintain similar functional profiles (Moya & Ferrer, 2016; Louca *et al*., 2018). Whether this holds for the chicken gut across production contexts can only be assessed with an integrated, multi-study dataset.

An integrated genomic reference is also needed for the development of microbiome-based alternatives to antimicrobials. Probiotic candidates must be evaluated not only for beneficial traits, such as bacteriocin production, but also for safety, including the absence of acquired resistance to clinically relevant antimicrobials and of virulence factors (EFSA BIOHAZ Panel, 2023). Genome-resolved data allow both dimensions to be screened simultaneously across thousands of genomes, providing a rational basis for prioritising candidates for experimental validation.

In this study, we integrated raw sequencing data and publicly available MAGs from six independent chicken gastrointestinal metagenomic studies, conducted in five countries on three continents, into a uniformly quality-filtered catalogue of 11,224 genomes. Each genome was characterised for taxonomy, functional and metabolic potential, antimicrobial resistance, mobile genetic elements, virulence factors, CRISPR-Cas systems and bacteriocin biosynthetic gene clusters. These layers were then combined in a genomic screen for probiotic candidates. The resulting catalogue is intended as a genome-resolved reference for the chicken gut microbiome, supporting the surveillance of antimicrobial resistance and the rational selection of microbiome-based interventions in poultry production.

Results

Construction of the chicken gastrointestinal genome catalogue

Six publicly available genome-resolved metagenomic studies of the chicken gastrointestinal tract were integrated (Table 1). Together they span five countries on three continents: China (ICRGGC and PRJNA748109), the United Kingdom (PRJNA543206), Israel (PRJNA598014), Austria (PRJNA715658) and Brazil (PRJNA684454) (Figure 1). The integrated studies captured broad variation in host lineage, gastrointestinal sampling site, age, diet and antimicrobial exposure (Table 1). Host lineages included broiler and layer types (Ross 308, Lingnan yellow broiler, Lohmann Brown and Silkie). Sampled compartments covered the whole gastrointestinal tract, from the duodenum, jejunum and ileum to the caecum, colon, mucosa, cloaca and faeces. Age at sampling ranged from hatch to adulthood. Where reported, diets consisted of standard commercial broiler or layer formulations or of maize-soybean diets with age-dependent proportions. Antimicrobial exposure was documented only in PRJNA598014, in which broilers received bacitracin, enrofloxacin or both, alongside an untreated control group; all other studies reported no antimicrobial administration. For PRJNA598014, only cloacal swab samples were retained, and litter samples were excluded to restrict the dataset to gastrointestinal material.

Two complementary data streams were combined. For the two studies that provided only raw reads (PRJNA684454 and PRJNA598014), 98 sequencing runs were retrieved from the Sequence Read Archive, assembled and binned, yielding 5,601 MAGs. For the four studies that had already released assembled genomes (ICRGGC, PRJNA543206, PRJNA715658 and PRJNA748109), 14,129 public MAGs were retrieved directly. The MAGs of PRJNA748109 had been reconstructed by the original authors from high-fidelity long-read assemblies. The two streams did not overlap and together comprised 19,730 MAGs before quality filtering.

After uniform quality filtering (completeness ≥85% and contamination ≤10%), 11,224 MAGs (56.9%) were retained; they constitute the genome catalogue used in all subsequent analyses (Table 2). Retention was lower among de novo MAGs (842 of 5,601; 15.0%) than among public MAGs (10,382 of 14,129; 73.5%), as expected, since the public MAGs had already undergone quality screening by the original authors. Retained MAGs had a mean completeness of 93.0% and a mean contamination of 1.83%. Of these, 65.8% met the stricter high-quality threshold of ≥90% completeness and ≤5% contamination, 235 were estimated to be 100% complete, and 1,443 had no detectable contamination. Contributions varied widely among BioProjects, from 135 MAGs in PRJNA715658 to 9,033 in ICRGGC, which alone accounts for 80.5% of the catalogue.

Because of this imbalance, and because MAGs reconstructed from the same assembly are not independent observations, downstream comparisons are presented as MAG-based profiles rather than as estimates of organismal abundance in the original communities.

Taxonomic composition and diversity

Taxonomic classification of the 11,224 MAGs under the GTDB framework resolved 26 phyla, 829 genera and 1,977 species. Five phyla accounted for 88.7% of all MAGs: Bacillota_A (4,732 MAGs; 42.1%), Bacteroidota (1,879; 16.7%), Bacillota (1,651; 14.7%), Actinomycetota (857; 7.6%) and Pseudomonadota (835; 7.4%) (Figure 2A). They were followed by Bacillota_C (2.3%), Campylobacterota (1.8%), Desulfobacterota (1.6%), Cyanobacteriota (1.3%) and Spirochaetota (1.1%), while the remaining 16 phyla together comprised 3.4% of the catalogue. Archaeal MAGs, classified within Methanobacteriota, Halobacteriota and Thermoplasmatota, represented 1.0% of the catalogue (113 MAGs), and 99 of them derived from ICRGGC. At class level, Clostridia accounted for 42.1% of all MAGs, followed by Bacteroidia (16.7%), Bacilli (14.7%), Actinomycetia (5.5%) and Gammaproteobacteria (5.3%). At order level, Oscillospirales (17.9%), Bacteroidales (15.7%), Lachnospirales (14.3%) and Lactobacillales (10.1%) together represented 58.1% of the catalogue. This composition reflects the predominance of obligately anaerobic fermenters and lactic acid bacteria across the sampled compartments. The most represented genera were *Limosilactobacillus* (400 MAGs; 3.6%) and *Ligilactobacillus* (342; 3.0%), followed by *Alistipes* (267; 2.4%), *Mediterraneibacter* (240; 2.1%), *Phocaeicola* (225; 2.0%), *Faecalibacterium* (220; 2.0%), *Gemmiger* (204; 1.8%), *Corynebacterium* (196; 1.7%), *Cryptobacteroides* (170; 1.5%) and *Escherichia* (165; 1.5%) (Figure 2B).

A large fraction of the catalogue lacked formally described taxa: 45.7% of species and 35.3% of genera were represented exclusively by provisional GTDB designations rather than validly published names. This undescribed diversity was unevenly distributed across phyla. The highest proportions of provisional species were found in Verrucomicrobiota (77.4%), Cyanobacteriota (73.3%) and Spirochaetota (66.7%), whereas well-characterised phyla such as Actinomycetota (22.6%) and Bacillota (26.8%) showed the lowest proportions.

The composition of the catalogue differed markedly among BioProjects (Figure 2C). Bacillota_A was the most represented phylum in five of the six BioProjects, ranging from 33.3% of MAGs in PRJNA598014 to 74.8% in PRJNA715658. The exception was

PRJNA684454, in which Pseudomonadota predominated (31.6%), followed by Bacteroidota (21.7%) and Bacillota_A (21.6%). Bacteroidota, the second most represented phylum in the catalogue as a whole, ranged from 2.2% of MAGs in PRJNA715658 to 21.7% in PRJNA684454. Bacillota was particularly prominent in PRJNA748109 (34.2%) and PRJNA598014 (24.0%), consistent with the proximal intestinal and cloacal origin of these samples, respectively.

The number of distinct taxa recovered also varied widely across BioProjects, from 54 genera and 84 named species in PRJNA598014 to 589 genera and 1,487 species in ICRGGC. PRJNA543206 (338 genera), PRJNA684454 (259), PRJNA748109 (131) and PRJNA715658 (95) fell within this range (Table 2). This variation broadly tracked the number of MAGs contributed by each study. Overlap among BioProjects was limited. Only two genera, *Alistipes* and *Ruthenibacterium*, were recovered from all six BioProjects, and 25 genera from at least five. The latter included *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Phocaeicola*, *Mediterraneibacter*, *Gemmiger*, *Blautia*, *Bifidobacterium* and *Escherichia*. In contrast, 471 of the 829 genera (56.8%) were recovered from a single BioProject. The integration of multiple independent studies therefore substantially expanded the taxonomic breadth of the catalogue beyond that achievable from any single dataset.

Genome annotation and functional coverage

Gene prediction with Bakta identified 24,584,290 coding sequences (CDS) across the 11,224 MAGs, with a mean coding density of 85.65%. Of these CDS, 17.15% were annotated as hypothetical proteins. This proportion varied widely among phyla, from 11.4% in Bacillota_C to over 84% in the three archaeal phyla (Methanobacteriota, Halobacteriota and Thermoplasmatota). It was also elevated in the same poorly characterised bacterial phyla that showed the highest proportions of provisional taxa (Verrucomicrobiota, Cyanobacteriota and Spirochaetota). The high value in archaea partly reflects the bacterial focus of the Bakta reference databases. Orthology-based annotation with EggNOG-mapper assigned at least one hit to 21,502,852 CDS (87.47%), and 20,528,907 CDS (83.50%) were assigned to one or more Clusters of Orthologous Groups (COG) categories, totalling 21,708,775 gene-to-category assignments.

Carbohydrate-active enzyme repertoire

dbCAN3 identified 718,857 carbohydrate-active enzyme (CAZyme) annotations,

corresponding to 2.92% of all predicted CDS, with a mean of 68.07 annotations per MAG (median 54.0). Glycoside hydrolases (GH) were the most represented class (385,160 annotations; 53.6%), followed by glycosyltransferases (GT; 234,466; 32.6%), carbohydrate esterases (CE; 52,288; 7.3%), carbohydrate-binding modules (CBM; 32,239; 4.5%), polysaccharide lyases (PL; 10,092; 1.4%) and auxiliary activities (AA; 4,542; 0.6%). Among individual families, GT2 was the most frequent (91,173 annotations), followed by GT4 (49,328), GH13 (39,531), GH2 (29,185) and GH3 (26,950) (Figure 3A). No PL or AA family ranked among the 30 most frequent families; their contribution was spread across many low-frequency families.

Glycoside hydrolase content differed markedly among phyla (Figure 3B). Bacteroidota showed the highest mean GH density among well-represented phyla (72.0 GH annotations per MAG), about twice that of Bacillota_A (36.8), the most represented phylum, and of Actinomycetota (30.2), and nearly four times that of Bacillota (18.7). High densities were also observed in Verrucomicrobiota (56.8), whereas Campylobacterota carried very few glycoside hydrolases (3.5). Bacteroidota and the Bacillota phyla shared the same dominant GH families (GH2, GH3, GH13 and GH43). The main difference lay in a small set of families enriched in Bacteroidota, notably GH92 and GH97, which are associated with the degradation of host-derived glycans such as N-glycans and mucin O-glycans.

COG functional categories

The distribution of COG functional groups was highly consistent across BioProjects (Figure 3C). Mean values across the six BioProjects (± SD) were: metabolism 38.1% ± 2.43% of annotations; poorly characterised or unknown function 20.1% ± 0.46%; information storage and processing 15.5% ± 1.22%; defence and DNA-related functions 8.93% ± 1.78%; cell structure 8.70% ± 0.36%; and other functions 8.59% ± 0.85%. The most variable individual category was L (replication, recombination and repair), which ranged from 4.72% of annotations in PRJNA684454 to 9.33% in PRJNA748109. At genus level, the highest proportions of category L were found in *Ligilactobacillus* (8.61%) and *Limosilactobacillus* (7.61%). Category L includes transposases, and both genera also carry a high load of insertion sequences (see *Mobile genetic elements*). This genus-level enrichment is therefore consistent with their elevated genomic mobility rather than with a distinct replication or repair capacity.

Metabolic pathway completeness

KEGG-Decoder analysis of 62 metabolic pathways revealed broad but unevenly distributed metabolic potential. Amino acid biosynthesis was the most completely encoded functional group, with a mean pathway completeness of 0.71 and 69.5% of MAGs encoding at least one complete pathway in this group. It was followed by carbohydrate fermentation (mean 0.44; 33.8% of MAGs), short-chain fatty acid (SCFA) and fermentation-product pathways (0.32; 24.9%), vitamin biosynthesis (0.27; 18.4%), respiration and energy metabolism (0.26; 22.1%) and polysaccharide degradation (0.21; 21.0%). Nitrogen metabolism was the least completely encoded group (0.05; 4.5%). Within amino acid biosynthesis, mean completeness varied widely among individual pathways. It was highest for glutamine (93.2%), glycine (92.6%), serine (89.3%), lysine (88.1%), threonine (86.3%) and proline (82.4%), and lowest for tryptophan (51.8%), alanine (48.8%) and tyrosine (15.0%).

Metabolic potential was not proportional to numerical representation. Among the 20 most represented genera, completeness of fermentation pathways varied substantially (Figure 3D). Among genera represented by at least ten MAGs, the highest completeness of SCFA and fermentation pathways was found in *Rothia* (57.1%; n = 12 MAGs), followed by *Escherichia* (54.2%; n = 165), *Caproicibacterium* (50.0%; n = 22), *Gallibacterium* (49.8%; n = 37) and *Ruoffia* (48.4%; n = 13). For vitamin biosynthesis, *Escherichia* ranked highest (68.6%), followed by *Catenibacillus* (60.0%; n = 10), *Mucispirillum* (56.1%; n = 36), *Anaeromassilibacillus* (52.9%; n = 14) and *Desulfovibrio* (52.8%; n = 117).

Resistome composition across the genome catalogue

Screening of the genome catalogue with AMRFinderPlus returned 13,702 hits classified as antimicrobial resistance determinants, detected in 6,028 MAGs (53.7%) and spanning 315 gene symbols and 30 resistance classes. Most of these hits (8,798; 64.2%), however, were detected exclusively through HMM searches, with a mean identity of 56.3% to the closest reference protein (85.5% below 70% identity). They were dominated by generic family-level assignments, such as *vanR* (1,671), *bla* (1,657), *vanT* (809), *catA* (761) and *vanG* (670). These hits therefore indicate homology to resistance-associated protein families rather than the presence of characterised resistance genes; they were treated as putative homologues and excluded from the quantitative resistome. A further 79 hits carried internal stop codons and were considered putatively non-functional.

The remaining 4,825 reference-matched hits (mean identity 99.1%) were distributed across 1,607 MAGs (14.3%) and 271 gene symbols. Of these, 163 hits in 141 MAGs (1.3%) corresponded to species-specific chromosomal determinants and were classified as intrinsic, most frequently *cblA* (66 hits) and *cepA* (17 hits), both characteristic of *Bacteroides*. The remaining 4,662 hits were classified as acquired and were distributed across 1,533 MAGs (13.7% of the catalogue), 235 gene symbols and 27 resistance classes. Aminoglycoside resistance genes were the most frequent (1,393 hits), followed by tetracycline (980), lincosamide (455), lincosamide/macrolide/streptogramin (448), macrolide (247) and phenicol (232) resistance genes. Next came *cfr*-type ribosomal methyltransferases conferring combined phenicol, lincosamide, oxazolidinone, pleuromutilin and streptogramin A resistance (198), and streptothricin (166), fosfomycin (111) and β-lactam (91) resistance genes. At gene level, *tet(W)* (302 hits), *lnu(C)* (251), *aph(3')-IIIa* (244), *aadE* (209), *erm(B)* (203), *ant(6)-Ia* (170), *aad9* (168) and *sat4* (160) were the most frequently detected acquired genes.

The contribution of acquired determinants varied markedly across BioProjects (Table 3). It ranged from 5.3% of AMR hits in PRJNA715658 (7 of 132) to 81.5% in PRJNA748109 (2,480 of 3,043), with PRJNA543206 (14.5%), PRJNA684454 (18.4%), ICRGGC (21.4%) and PRJNA598014 (31.4%) falling within this range. PRJNA598014 was the only BioProject with documented antimicrobial exposure (bacitracin and enrofloxacin). Its acquired genes included a complete *vanA* operon, *poxtA*, *cfr(E)*, several tetracycline (*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)*, *tet(K)*, *tet(Q)*), macrolide (*erm(C)*, *mef(A)*, *msr(D)*) and trimethoprim (*dfrG*, *dfrE*, *dfrD*) resistance genes. None of these corresponds directly to bacitracin or fluoroquinolone resistance mechanisms.

At phylum level, the proportion of MAGs carrying acquired resistance genes was highest in Bacillota (19.7%; 325 of 1,651) and Bacillota_C (19.4%; 49 of 253). It was intermediate in Actinomycetota (15.8%), Bacteroidota (13.7%), Bacillota_A (11.9%) and Pseudomonadota (10.8%), and lowest in Campylobacterota (6.1%). At genus level, acquired resistance was concentrated among commensal lineages typical of the avian gut (Figure 4). The largest numbers of affected MAGs belonged to *Ligilactobacillus* (94 of 342 MAGs; 27.5%), *Bacteroides* (61 of 125; 48.8%), *Faecalibacterium* (58 of 220; 26.4%), *Romboutsia* (50 of 52; 96.2%), *Lactobacillus* (47 of 125; 37.6%), *Phocaeicola* (44 of 225; 19.6%), *Limosilactobacillus* (43 of 400; 10.8%) and *Bifidobacterium* (33 of 112; 29.5%). All 19 *Mammaliicoccus* MAGs carried acquired genes. In contrast, no acquired resistance gene was detected among the 165 *Escherichia* or 58

Campylobacter_D MAGs.

Combining acquired resistance classes at MAG level, 437 MAGs (3.9% of the catalogue) met the multidrug-resistance (MDR) threshold of three or more classes. Of these, 283 carried acquired genes from four or more classes, with a maximum of 11 classes in a single genome. MDR MAGs were concentrated in PRJNA748109 (270) and ICRGGC (130), followed by PRJNA684454 (24), PRJNA543206 (9) and PRJNA598014 (4). They belonged predominantly to Bacillota_A (214 MAGs), Bacillota (82) and Bacteroidota (82). The most frequent genera were *Faecalibacterium* (28), *Ligilactobacillus* (25), *Bacteroides* (23), *Lactobacillus* (20), *Phocaeicola* (17) and *Mediterraneibacter* (16). The genomes with the highest acquired-class burden, however, belonged to *Enterococcus_E cecorum*, a recognised opportunistic pathogen of broiler chickens. All five *E. cecorum* MAGs carrying acquired genes met the MDR threshold, with up to 11 classes per genome. They carried *erm(B)*, *tet(M)*, *tet(L)*, *ant(6)-Ia*, *aac(6')-Ie/aph(2")-Ia*, *lsa(E)*, *lnu(B)* and, in two cases, *optrA*. Across the catalogue, 688 contigs from 629 MAGs carried two or more distinct acquired genes, consistent with linkage of resistance determinants within shared genomic regions.

Genes of critical clinical or veterinary concern were detected in 76 MAGs (0.68% of the catalogue), distributed across ICRGGC (42), PRJNA748109 (22), PRJNA684454 (7), PRJNA543206 (3) and PRJNA598014 (2) (Table 4). Oxazolidinone resistance genes formed the most frequent group. *poxtA* was found in 14 MAGs, predominantly *Lactobacillus gallinarum* and *L. crispatus*. *cfr(B)* was found in 10 MAGs belonging to genera of Bacillota and Bacillota_A. *optrA* was found in six MAGs, including *Ligilactobacillus salivarius* and *E. cecorum*, and *cfr* in three. The *cfr*-like genes *cfr(C)* and *cfr(E)* were also frequent, occurring in 105 and 69 MAGs, respectively. Tigecycline-inactivating monooxygenases were represented by *tet(X2)* (17 MAGs), *tet(X5)* (4) and *tet(X1)* (3). They occurred mainly in *Bacteroides* (*B. uniformis* and *B. fragilis*) and, in the case of *tet(X5)*, in Flavobacteriaceae. Thirteen of the 17 *tet(X2)* copies were co-located with other acquired resistance genes on the same contig. The 16S rRNA methyltransferase gene *npmA*, which confers high-level aminoglycoside resistance, was detected in 14 MAGs, most frequently in *Faecalibacterium* and *Gemmiger*. *mecA* was found together with its regulators *mecR1* and *mecI* on the same contig in two *Mammaliicoccus lentus* MAGs. A complete *vanA* operon (*vanR-A*, *vanS-A*, *vanH-A*, *vanA*, *vanX-A*, *vanY-A* and *vanZ-A*) was recovered on a single contig in one MAG from PRJNA598014, and a partial operon (*vanA*, *vanX-A*, *vanY-A* and *vanZ-A*) on a single contig in one MAG from

PRJNA543206.

Acquired β-lactamase genes of clinical relevance were rare. The extended-spectrum β-lactamase gene *blaCTX-M-14* was detected in a single MAG, an unclassified Enterobacteriaceae genome closest to *Kosakonia*. DHA-type plasmid-mediated AmpC genes were found in two MAGs, one of them assigned to *Morganella morganii*. *blaOXA-10* was found within a class 1 integron-like cassette array together with *sul1*, *aadA1*, *cmlA1* and *arr-2*. *blaOXA-1* was found adjacent to *catB3*, and *blaTEM-1* or *blaTEM-116* in three MAGs. Plasmid-mediated quinolone resistance was represented by *qnrS1*, co-located with *blaLAP-2*, and by *qnrB19*, each detected in a single MAG, and *fosA3* was found in one MAG. For the *vanA*, *qnr* and DHA-type genes, some of the assigned host genomes, namely *Bacteroides xylanisolvens*, *L. salivarius* and *Phascolarctobacterium faecium*, are not their usual hosts. These assignments are therefore interpreted with caution, as they may reflect the binning of mobile-element contigs into unrelated genomes.

No acquired carbapenemase (KPC, NDM, VIM, IMP or OXA-48-like) was detected; all carbapenem-associated hits corresponded to chromosomal, species-specific metallo-β-lactamases such as *cfiA* and *blaL1*. Likewise, no *mcr* gene was detected. A single HMM-only hit to the MCR-3-related phosphoethanolamine–lipid A transferase family (80.0% identity, 100% coverage) was recovered in an *Aeromonas hydrophila* MAG, consistent with the chromosomal *mcr-3*-like genes described in this genus. Finally, the narasin resistance operon *narAB*, relevant to the use of ionophore anticoccidials in poultry production, was detected in 11 MAGs.

Mobile genetic elements

Plasmid sequences were detected in 7,230 MAGs (64.4% of the catalogue) and insertion sequences (IS) in 4,249 MAGs (37.9%). Among plasmid-positive MAGs, the number of distinct plasmid sequences ranged from 1 to 298 per genome (median 4). Among IS-positive MAGs, the number of IS elements ranged from 1 to 64 (median 1). The relative prevalence of the two element types differed sharply between BioProjects. In PRJNA748109, plasmid sequences were detected in only 2.0% of MAGs, whereas insertion sequences were detected in 98.6%. The remaining five BioProjects showed the opposite pattern, with plasmid prevalence above 60% and IS prevalence between 28.9% and 48.8%. The MAGs of PRJNA748109 were reconstructed from long-read assemblies, in which circular plasmids are typically resolved as separate contigs and may not be

assigned to genome bins. This contrast therefore probably reflects, at least in part, differences in assembly and binning strategy.

To summarise the evidence of horizontal gene transfer potential within each genome, plasmid carriage, IS carriage and acquired resistance gene carriage were combined into a composite mobility score ranging from 0 to 3 (Figure 5). In total, 2,611 MAGs (23.2%) showed no evidence of mobility, 4,804 (42.8%) a single line of evidence, 3,249 (28.9%) two lines and 570 (5.1%) all three. The most frequent combinations were plasmids alone (34.5% of MAGs) and plasmids together with IS (21.6%), followed by IS alone (7.0%). Among MAGs carrying acquired resistance genes, the most frequent combination was the co-occurrence of all three indicators (5.1% of the catalogue), followed by acquired genes with IS (4.1%), acquired genes with plasmids (3.2%) and acquired genes alone (1.3%). The proportion of MAGs without any evidence of mobility ranged from 0.6% in PRJNA748109 to 25.4% in ICRGGC, and the mean score was highest in PRJNA748109 (1.83). Mean genome completeness was similar across score categories (92.6–94.0%; Pearson's r = 0.11 between score and completeness), indicating that genome quality did not drive these patterns.

Acquired resistance genes were strongly associated with insertion sequences. Of the 1,533 MAGs carrying acquired resistance genes, 90.5% also carried a plasmid or an IS, compared with 73.1% of MAGs without acquired genes. This association was driven by insertion sequences: IS were detected in 67.4% of MAGs with acquired genes versus 33.2% of the remaining MAGs (odds ratio = 4.17; Fisher's exact test, $p < 10^{-140}$). Plasmid sequences, in contrast, were not enriched (60.3% versus 65.0%; odds ratio = 0.82). The association with IS remained strong when PRJNA748109 was excluded (55.7% versus 32.6%; odds ratio = 2.61; $p < 10^{-50}$). It also persisted after stratification by BioProject (Mantel–Haenszel odds ratio = 2.55) and by phylum (3.84), indicating that it was not an artefact of differences in study composition or taxonomy.

Among phyla with more than 100 MAGs, the mean mobility score was highest in Bacillota (1.59), Actinomycetota (1.51) and Pseudomonadota (1.43), and lowest in Cyanobacteriota (0.47). Among genera with at least five MAGs, the highest mean scores were observed in *Romboutsia* (2.87; n = 52), *Mammaliicoccus* (2.74; n = 19) and *Psychrobacter* (2.40; n = 10). High scores were also observed in larger genera such as *Lactobacillus* (2.09; n = 125) and *Escherichia* (1.75; n = 165); in *Escherichia*, the score derived entirely from plasmid and IS carriage. Insertion sequences were detected in all *Psychrobacter* and 90.4% of *Romboutsia* MAGs. The two most represented lactobacilli

genera also showed elevated genomic mobility. Mean IS counts per MAG were 3.7-fold higher in *Ligilactobacillus* and 2.8-fold higher in *Limosilactobacillus* than the catalogue mean, and plasmid sequences were detected in 73.1% and 89.0% of their MAGs, respectively. This elevated IS load is consistent with the high proportion of COG category L annotations observed in both genera, since IS-encoded transposases are assigned to this category.

Virulence factors

Screening of the genome catalogue against the Virulence Factor Database (VFDB) identified 13,005 hits meeting the coverage and identity thresholds, distributed across 515 MAGs (4.6% of the catalogue). Virulence-associated genes were therefore restricted to a small fraction of the catalogue and were strongly concentrated in specific taxonomic groups. At phylum level, 334 of the 835 Pseudomonadota MAGs (40.0%) and 85 of the 198 Campylobacterota MAGs (42.9%) carried at least one virulence factor. These proportions were nearly an order of magnitude higher than in any other well-represented phylum, including Actinomycetota (4.6%), Bacillota (2.2%), Bacillota_C (1.6%), Bacteroidota (0.3%) and Bacillota_A (0.2%). The only member of the phylum Chlamydiota in the catalogue, a *Chlamydophila gallinacea* MAG, carried a type III secretion system-associated gene.

The proportion of MAGs carrying virulence factors ranged from 1.2% in PRJNA748109 to 22.2% in PRJNA684454, with ICRGGC, PRJNA543206, PRJNA598014 and PRJNA715658 falling between 1.5% and 10.0%. The predominant functional category also differed among BioProjects. Flagella-associated genes were the most frequent category in ICRGGC, PRJNA543206 and PRJNA748109, whereas enterobactin biosynthesis genes predominated in PRJNA684454 and capsule-associated genes in PRJNA598014.

Across the catalogue, 640 distinct virulence genes from 113 VFDB categories were detected, and the most frequent categories fell into two broad groups (Figure 6). The first comprised iron-acquisition systems: enterobactin (1,546 hits, plus 288 hits for a second enterobactin entry), yersiniabactin (199), the haem-uptake systems Chu (190) and Shu (166), salmochelin (177) and aerobactin (173). The second comprised surface and motility structures: flagella (1,404 hits), the type II secretion system (1,133), type 1 fimbriae (969), the *E. coli* common pilus (ECP; 830), the LEE-encoded type III secretion system (760), curli fibres (444), capsule (422) and type IV pili (281). Genes for

pseudaminic acid biosynthesis (749 hits), which glycosylates flagellin in Campylobacterota, were also among the most frequent. Category composition differed between the two dominant phyla. In Pseudomonadota, enterobactin, the type II secretion system, the LEE-encoded type III secretion system and type 1 fimbriae predominated. In Campylobacterota, flagella and pseudaminic acid biosynthesis genes accounted for most hits, and capsule-associated genes were also well represented.

AMRFinderPlus additionally identified toxin and virulence genes of direct relevance to poultry health. Four MAGs of *Sarcina perfringens* (*Clostridium perfringens* under the former nomenclature), the agent of necrotic enteritis, carried the alpha-toxin gene *cpa* and the perfringolysin gene *pfoA*. A *Romboutsia* MAG carried the beta2-toxin gene *cpb2*. Two *Escherichia coli* MAGs from PRJNA748109 carried the enteroaggregative heat-stable enterotoxin gene *astA*, the type III secretion effector *espX1*, the adhesin gene *fdeC*, the long polar fimbria genes *lpfA* and *lpfA-O113*, and the yersiniabactin transport genes *ybtP* and *ybtQ*. Genes typically associated with pathogenic *E. coli* were also recovered in non-enterobacterial MAGs. These included the LEE genes *eae*, *espA* and *espB* and the avian pathogenic *E. coli* autotransporter gene *tsh* in *Phascolarctobacterium faecium*, and the colicin V genes *cvaB* and *cvaC* in *Phocaeicola dorei*. As with the mobile resistance genes described above, these host assignments are unlikely to be biologically accurate and probably reflect the binning of mobile-element contigs into unrelated genomes.

CRISPR-Cas systems and their viral targets

Confirmed CRISPR-Cas systems, defined as a CRISPR array in genomic proximity to a complete, typeable *cas* operon, were identified in 2,652 MAGs (23.6% of the catalogue) and comprised 3,193 distinct operons (Figure 7A). Most CRISPR-Cas-positive MAGs (2,193; 82.7%) carried a single system, whereas the remainder carried between two and five. The proportion of MAGs with a confirmed system ranged from 21.3% in PRJNA543206 to 47.4% in PRJNA748109, with ICRGGC (22.1%), PRJNA684454 (26.8%), PRJNA598014 (27.6%) and PRJNA715658 (28.1%) falling within this range. A further 1,999 MAGs carried *cas*-like genes near a CRISPR array that did not resolve into a complete, typeable operon. These loci were not counted as CRISPR-Cas systems.

All 3,193 confirmed operons were assigned to a subtype (Figure 7B). Type I systems were the most frequent (1,840 operons; 57.6%), mainly subtypes I-C (1,010), I-

E (469) and I-B (246), with smaller numbers of I-F (77), I-G (34), I-A (2) and I-D (1). Type II accounted for 802 operons (25.1%), predominantly subtypes II-A (511) and II-C (265). Type III accounted for 460 operons (14.4%), predominantly III-A (298) and III-D (109). Types V and VI, which use single RNA-guided effector proteins, were rare: together they accounted for 80 operons (2.5%), distributed across subtypes V-A, V-B1, V-F1, VI-A, VI-B1, VI-C and VI-D. Fourteen MAGs carried hybrid operons combining features of more than one subtype.

Among phyla with more than 100 MAGs, the proportion of MAGs with a confirmed system ranged from 16.6% in Actinomycetota to 58.5% in Desulfobacterota. Bacillota_A, the most represented phylum, was close to the catalogue average (24.1%). Type I systems predominated in Bacillota_A, Bacillota, Pseudomonadota and Desulfobacterota. Type II predominated in Bacteroidota (61.2% of the systems in this phylum), and Type III in the archaeal phylum Methanobacteriota.

Comparison of CRISPR spacer sequences against viral reference genomes yielded 104,769 matches (mean identity 98.8%). These originated from 3,286 MAGs (29.3% of the catalogue) and targeted 11,423 distinct viral genomes (Figure 7C). Nearly all matches (102,962; 98.3%) were assigned to the class Caudoviricetes, which comprises the tailed bacteriophages. Within this class, 46,850 matches (from 2,191 MAGs) targeted proviral, that is, integrated, sequences, and 51,265 (from 2,961 MAGs) targeted viral genomes without detectable terminal repeats. Fewer matches targeted genomes with direct (4,673) or inverted (174) terminal repeats. Matches assigned to named families or orders below class level, including Autographiviridae, Herelleviridae, Microviridae and the order Crassvirales, totalled 390. The remaining 1,417 matches were either unclassified (221) or lacked taxonomic assignment (1,196).

Spacer-virus matches were unevenly distributed among host phyla. Among the five phyla with the most MAGs carrying at least one match, Bacillota_C showed the highest proportion of matching MAGs (181 of 253; 71.5%). It was followed by Bacillota_A (1,330 of 4,732; 28.1%), Bacillota (436 of 1,651; 26.4%), Bacteroidota (480 of 1,879; 25.5%) and Actinomycetota (178 of 857; 20.8%). The number of distinct viral targets broadly scaled with the number of matching MAGs, from 620 viruses targeted by Bacillota_C to 5,064 by Bacillota_A.

Bacteriocin biosynthetic gene clusters

BAGEL4 identified 2,280 areas of interest (AOIs) containing bacteriocin-

associated biosynthetic gene clusters, distributed across 1,662 MAGs (14.8% of the catalogue) and assigned to eleven classes (Figure 8A). The largest single category corresponded to lytic enzymes (893 AOIs; 39.2%). These are autolysins and bacteriolytic enzymes located within bacteriocin-associated regions rather than ribosomally synthesised bacteriocins in the strict sense. The remaining AOIs comprised Lactobacillales bacteriocins (306; 13.4%), lanthipeptides (227; 10.0%), unclassified bacteriocins (213; 9.3%), other characterised bacteriocins (193; 8.5%), colicins and microcins (185; 8.1%), UviB-type class II bacteriocins (152; 6.7%), thiopeptides and linear azol(in)e-containing peptides (72; 3.2%), enterocins (15; 0.7%), other ribosomally synthesised and post-translationally modified peptides (RiPPs; 14; 0.6%) and sactipeptides (10; 0.4%). The category of other characterised bacteriocins included homologues of lactococcin 972, lactacin F, bovicin 255, sakacin T and prochlorosins. Excluding lytic enzymes, 1,387 AOIs corresponding to bacteriocins and bacteriocin-like peptides were identified in 1,047 MAGs (9.3% of the catalogue).

The proportion of MAGs with at least one AOI ranged from 11.8% in PRJNA543206 to 26.8% in PRJNA748109, with PRJNA598014 (14.7%), ICRGGC (14.8%), PRJNA715658 (19.3%) and PRJNA684454 (24.6%) falling within this range. ICRGGC contributed the largest number of AOIs (1,706), followed by PRJNA684454 (211), PRJNA748109 (187), PRJNA543206 (108), PRJNA715658 (36) and PRJNA598014 (32), broadly reflecting the size of each collection. Between six (PRJNA598014) and eleven (ICRGGC) distinct classes were detected per BioProject.

Among phyla with more than 100 MAGs, AOIs were most frequent in Bacillota (38.4% of MAGs; 634 of 1,651). They were less frequent in Pseudomonadota (19.4%; 162 of 835), Actinomycetota (17.6%; 151 of 857), Desulfobacterota (17.5%; 32 of 183) and Bacillota_C (15.4%; 39 of 253). Bacillota_A, the most represented phylum, showed a comparatively low proportion (11.5%; 546 of 4,732).

At genus level, three genera of the order Lactobacillales contributed the largest numbers of AOIs: *Ligilactobacillus* (337 AOIs in 171 MAGs), *Lactobacillus* (268 in 117) and *Limosilactobacillus* (256 in 211), which together accounted for 37.8% of all AOIs. They were followed by *Escherichia* (133 AOIs in 56 MAGs) and *Acutalibacter* (117 AOIs in 117 MAGs, all corresponding to lytic enzymes), and then by *Merdisoma* (47), CAG-266 (41), *Brevibacterium* (40), *Enterococcus_E* (35) and *Ornithoclostridium* (31) (Figure 8B). Class composition differed markedly among these genera. In *Lactobacillus* and *Ligilactobacillus*, Lactobacillales bacteriocins were the largest category (148 and 128

AOIs, respectively). In *Limosilactobacillus*, by contrast, almost all AOIs (245 of 256) corresponded to lytic enzymes rather than bacteriocins in the strict sense. *Bifidobacterium* contributed 22 AOIs, mostly unclassified bacteriocins (17). In *Escherichia*, AOIs were almost exclusively colicins and microcins (124 of 133). Outside *Escherichia*, this class was found mainly in other Gammaproteobacteria, including *Gallibacterium* (28 AOIs), *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*.

Genomic screening of probiotic candidates

Of the 11,224 MAGs, 1,379 (12.3%) belonged to the sixteen genera considered in the probiotic screen. These comprised traditional probiotic genera with a history of safe use in food and feed (e.g., *Lactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Bifidobacterium*) and genera proposed as next-generation probiotics (*Faecalibacterium*, *Akkermansia* and *Blautia*). The most represented were *Limosilactobacillus* (400 MAGs), *Ligilactobacillus* (342), *Faecalibacterium* (220), *Blautia* (132), *Lactobacillus* (125) and *Bifidobacterium* (112), followed by *Akkermansia* (18), *Enterococcus* (14) and *Levilactobacillus* (11). The genera *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Loigolactobacillus* and *Pediococcus* were each represented by one or two MAGs, and *Lentilactobacillus*, *Bacillus* and *Ruminococcus* were not recovered.

Exclusion was driven predominantly by acquired antimicrobial resistance. A total of 210 MAGs (15.2% of those screened) carried at least one acquired resistance gene in a class of clinical or veterinary concern (Figure 9). The genes involved were mainly macrolide–lincosamide–streptogramin B genes (128 MAGs, mostly *erm(B)*), tetracycline resistance genes (120 MAGs, mostly *tet(W)*, *tet(L)* and *tet(M)*) and phenicol resistance genes (80 MAGs, mostly *catA* and *fexB*). Oxazolidinone resistance genes were also present in 34 of these MAGs, including *poxtA* (10 MAGs) and *optrA* (3). The proportion of excluded MAGs differed markedly among genera. It was highest in *Lactobacillus* (42 of 125; 33.6%) and *Ligilactobacillus* (77 of 342; 22.5%), intermediate in *Bifidobacterium* (17.9%), *Akkermansia* (16.7%) and *Faecalibacterium* (14.5%), and lowest in *Limosilactobacillus* (7.0%) and *Blautia* (6.1%). It also differed among BioProjects, from 9.8% of screened MAGs in ICRGGC to 62.1% in PRJNA748109. In addition, 22 MAGs were excluded for carrying virulence factors, including all 14 *Enterococcus* MAGs, the only genus in which every MAG failed this criterion. After both exclusion criteria were applied, 1,148 MAGs (83.2% of those screened; 10.2% of the catalogue) were retained as probiotic candidates.

Cross-referencing the probiotic candidates with the bacteriocin catalogue showed that 36.0% of candidates carried at least one AOI and 17.1% carried a bacteriocin in the strict sense, excluding lytic enzymes. These proportions are 2.4- and 1.8-fold higher, respectively, than across the whole catalogue (14.8% and 9.3%). Bacteriocin-encoding candidates were concentrated in *Lactobacillus* (68 of 83 candidates; 81.9%) and *Ligilactobacillus* (102 of 265; 38.5%), with smaller contributions from *Bifidobacterium* (16 of 92; 17.4%), *Limosilactobacillus* (7 of 372; 1.9%) and *Blautia* (3 of 124). No bacteriocin was detected among *Faecalibacterium* or *Akkermansia* candidates. Bacteriocin potential was, however, even more frequent among the MAGs excluded for acquired resistance (41.0%) than among the retained candidates (17.1%). The genera with the greatest competitive potential were thus also those most affected by the safety criterion, indicating that genomic safety and bacteriocin production do not co-vary uniformly across the screened genera.

Discussion

This study integrated six independent genome-resolved metagenomic datasets into a uniformly quality-filtered catalogue of 11,224 MAGs from the chicken gastrointestinal tract. The catalogue spans five countries, broiler and layer lineages, the whole length of the gastrointestinal tract, and production contexts with and without antimicrobial exposure. Previous genome-resolved surveys of the chicken gut have largely been anchored to single studies or regions (Gilroy *et al*., 2021; Segura-Wang *et al*., 2021). Even the largest integrated catalogues were built predominantly from samples of a single country (Feng *et al*., 2021), or explicitly identified the integration of multiple origins, breeds and production systems as a remaining gap (Wang *et al*., 2024). The present catalogue addresses this gap in two ways. It combines, under a single quality standard and a single annotation pipeline, data that had previously been analysed in isolation. It also annotates every genome across complementary layers of information, from taxonomy and metabolic potential to resistance, mobility, virulence, defence, antimicrobial peptide production and probiotic candidacy. Its principal value is therefore that of a reference resource: a genome-level map in which each trait of interest can be traced to a specific lineage, BioProject and production context.

Two structural features of the catalogue condition its interpretation. First, ICRGGC contributed 80.5% of the retained MAGs, so catalogue-wide proportions are weighted towards that collection, and BioProject-level comparisons are more informative

than pooled values for the smaller studies. Second, all analyses are based on MAG counts rather than on the abundance of organisms in the original samples. The number of MAGs recovered for a given taxon depends on its abundance, but also on sequencing depth, sequencing technology, assembly strategy and binning success, all of which differed among the integrated studies. For these reasons, the catalogue is best suited to describing which genomes and genomic traits are present in the chicken gut microbiome, and in which lineages they occur. It is less suited to quantitative comparisons of community structure among production contexts.

The predominance of Bacillota_A, Bacteroidota and Bacillota in the catalogue agrees with previous amplicon-based and metagenomic surveys of the avian gut (Oakley *et al*., 2014; Sergeant *et al*., 2014; Feng *et al*., 2021). The BioProject-level profiles show, however, that this general picture conceals substantial heterogeneity among studies. Bacteroidota ranged from 2% to 22% of MAGs, and Pseudomonadota predominated in the Brazilian dataset. Only two genera were recovered from all six BioProjects, and more than half of all genera were recovered from a single one. Part of this heterogeneity is biological, reflecting differences in host lineage, age, diet and intestinal compartment. Part of it is methodological, since the studies differed in sample type, sequencing technology and binning strategy. With six BioProjects, the present dataset cannot separate these sources of variation. It does show, nonetheless, that any single study captures only a fraction of the taxonomic breadth of the chicken gut microbiome, and that integration across studies is necessary to obtain a representative genomic reference.

Nearly half of the species in the catalogue lacked a validly published name, and this undescribed diversity was concentrated in Verrucomicrobiota, Cyanobacteriota and Spirochaetota, phyla that are poorly represented in reference databases. The same lineages also showed the highest proportions of genes of unknown function. Taxonomic and functional knowledge gaps in the chicken gut microbiome therefore overlap: the lineages that remain undescribed are also those for which the least functional information is available. These lineages are a logical priority for targeted cultivation, long-read sequencing and functional characterisation.

In contrast with the taxonomic heterogeneity, the distribution of broad functional categories was remarkably stable across BioProjects, with every major COG functional group varying by only a few percentage points. This is consistent with the functional redundancy described for other host-associated microbiomes, in which phylogenetically distinct assemblages maintain similar functional profiles (Turnbaugh *et al*., 2009; Qin *et*

al., 2010). Some caution is warranted, however, because broad COG categories are coarse descriptors that tend to be stable in any large bacterial dataset. The added value of the present analysis lies in showing that this stability holds across geographically and technically independent studies, rather than in the stability itself.

Beneath this aggregate stability, genome-resolved analysis revealed marked differences among lineages. Bacteroidota carried about twice as many glycoside hydrolases per genome as Bacillota_A and nearly four times as many as Bacillota, in line with their established role as primary degraders of complex polysaccharides (Flint *et al*., 2012). Both groups nonetheless shared the same dominant GH families, and the main distinction lay in a small set of families enriched in Bacteroidota, such as GH92 and GH97, which act on host-derived N-glycans and mucin O-glycans (Berkhout *et al*., 2022). This suggests partially distinct but largely overlapping substrate preferences, rather than the strict separation between primary degraders and secondary fermenters proposed by classical cross-feeding models (Culp & Goodman, 2023). Pathway completeness also varied widely among amino acids, from over 90% for glutamine and glycine to 15% for tyrosine. This pattern is consistent with a community that relies on dietary supply or cross-feeding for some amino acids. Ranking genera by pathway completeness, rather than by abundance, also highlighted lineages whose metabolic potential would otherwise be overlooked. Examples are *Rothia* for fermentation pathways, consistent with the broad carbohydrate-processing repertoire described for this genus (Fernandes de Oliveira *et al*., 2022), and *Catenibacillus* for vitamin biosynthesis, consistent with the complete cobalamin pathway reported in all sequenced strains (Goris & Braune, 2024). The high completeness observed in *Escherichia* for both groups of pathways reflects the metabolic versatility of this facultative anaerobe and its well-annotated reference genomes.

Once family-level HMM homologues were separated from reference-matched genes, the resistome revealed a substantial acquired component: 13.7% of MAGs carried at least one acquired resistance gene and 3.9% met the genotypic multidrug-resistance threshold. The dominant acquired genes, *tet(W)*, *erm(B)*, *lnu(C)*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia* and *sat4*, are among the most widely reported determinants in the gut resistome of food-producing animals (Munk *et al*., 2018; Xiong *et al*., 2018). Their high prevalence is consistent with the long history of tetracycline, macrolide, lincosamide and aminoglycoside use in poultry production. Distinguishing between evidence categories proved critical to interpretation. Most raw AMRFinderPlus hits reflected low-identity homology to resistance-associated protein families rather than characterised resistance

genes. Treating such hits as evidence of resistance, or as intrinsic determinants, would have both inflated the overall prevalence of resistance and obscured the acquired fraction that carries epidemiological relevance (Crits-Christoph *et al*., 2022).

Acquired resistance and multidrug resistance were concentrated among commensal genera such as *Ligilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* and *Bifidobacterium*, rather than among classical enteric pathogens. This observation matters in two ways. First, it shows that the commensal community constitutes a substantial reservoir of transferable resistance, in line with the view of the gut microbiome as a reservoir from which resistance genes can be mobilised into pathogenic lineages (Crits-Christoph *et al*., 2022). Second, it bears directly on probiotic development, as discussed below. The notable exception to this commensal pattern was *Enterococcus cecorum*, an emerging cause of spondylitis and osteomyelitis in broilers (Jung *et al*., 2018). Its genomes showed the highest multidrug-resistance burden of the catalogue and included *optrA*, which makes this species a relevant target for resistance surveillance in poultry.

Although rare at the scale of the whole catalogue (0.68% of MAGs), genes of critical clinical relevance were present in five of the six BioProjects. These included oxazolidinone resistance genes (*optrA*, *poxtA*, *cfr*, *cfr(B)*), tigecycline-inactivating *tet(X)* variants, a complete *vanA* operon, *mecA*, *blaCTX-M-14*, DHA-type AmpC genes, *qnrS1*, *qnrB19*, *fosA3* and *npmA*. Oxazolidinones and tigecycline are last-resort agents in human medicine and are not authorised for use in poultry. Their resistance genes are nonetheless increasingly reported in food-producing animals, where co-selection by phenicols such as florfenicol and by tetracyclines is thought to maintain them (He *et al*., 2019; Schwarz *et al*., 2021). Consistent with this, *floR* was detected in 26 MAGs, and most *tet(X2)* copies were co-located with other acquired resistance genes. The complete *vanA* operon was recovered from PRJNA598014, the only cohort with documented antimicrobial exposure. Its presence in the absence of glycopeptide use is consistent with the long-term persistence of *vanA* in poultry environments after the withdrawal of avoparcin as a growth promoter (Sørum *et al*., 2006). Similarly, the detection of the narasin resistance operon *narAB* reflects a selective pressure specific to poultry production, where ionophores are widely used as anticoccidials (Naemi *et al*., 2020).

The absence of *mcr* genes and of acquired carbapenemases, together with the absence of acquired resistance among the 165 *Escherichia* MAGs, should be interpreted with caution. *mcr* genes, extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases are

predominantly plasmid-borne in Enterobacterales (Liu *et al*., 2016), and plasmid contigs are frequently lost or misassigned during the binning of short-read assemblies. Genome-resolved surveys are therefore expected to underestimate these determinants and to assign them to unexpected hosts. This was observed here for *vanA*, *qnrS1* and *blaDHA-1*, and for several virulence genes typical of pathogenic *E. coli*, which were recovered in Bacteroidota and Bacillota MAGs. The markedly higher proportion of acquired determinants in PRJNA748109, whose MAGs were derived from long-read assemblies, supports the view that assembly contiguity strongly influences the detection of mobile resistance genes. Screening of unbinned contigs and of long-read or Hi-C data will therefore be required before the absence of these determinants from the chicken gut microbiome can be asserted.

The mobilome analysis adds a further layer to this picture. Genomes carrying acquired resistance genes were four times more likely to carry insertion sequences than the remainder of the catalogue. This association persisted after excluding the long-read dataset and after stratification by BioProject and by phylum, which argues against a compositional or technical artefact. Plasmid carriage, in contrast, was not enriched among these genomes. Two explanations, not mutually exclusive, may account for this difference. First, in the gut commensals that dominate the acquired resistome, many resistance genes are carried by chromosomally integrated transposons and IS-flanked elements rather than by plasmids, and the interplay between IS and other mobile elements is a major route of resistance mobilisation (Che *et al*., 2021). Second, plasmid detection in MAGs is inherently limited by the binning losses discussed above. In either case, the association describes co-occurrence within genomes, not demonstrated transfer events. It is nonetheless consistent with Hi-C evidence that resistance genes are shared among gut taxa more widely than short-read data suggest (Stalder *et al*., 2019). The elevated insertion sequence load of *Ligilactobacillus* and *Limosilactobacillus*, reflected in their high proportion of COG category L annotations, points to a lineage-specific propensity for genomic plasticity in these dominant proximal-gut colonisers. Such plasticity may favour rapid adaptation in densely populated microbial communities (Brito, 2021).

Virulence-associated genes were restricted to a small fraction of the catalogue and concentrated in Pseudomonadota and Campylobacterota, the phyla that include the main enteric and zoonotic pathogens of poultry. The dominant categories, namely iron-acquisition systems, flagella, fimbriae and secretion systems, are also widespread among commensal strains of these phyla (Yang *et al*., 2022). Their presence therefore indicates

colonisation and fitness potential rather than pathogenicity per se. The same reasoning applies to the *Clostridium perfringens* genomes. The alpha-toxin and perfringolysin genes are present in virtually all strains of the species, whereas the ability to cause necrotic enteritis depends mainly on the NetB toxin (Keyburn *et al*., 2008). The single *Chlamydophila gallinacea* MAG is also noteworthy. This species is now recognised as the endemic chlamydial agent of chickens and is typically associated with subclinical infection (Guo *et al*., 2016), and the type III secretion gene detected is consistent with the obligate intracellular biology of the genus.

Confirmed CRISPR-Cas systems were present in nearly a quarter of the catalogue, and their spacers predominantly targeted tailed bacteriophages of the class Caudoviricetes, including a large fraction of integrated proviruses. This indicates that phage predation is a pervasive selective pressure in the chicken gut, and that many of the phages targeted are themselves resident in bacterial genomes of the same community. Whether CRISPR-Cas immunity restricts horizontal gene transfer at the genome-wide scale remains debated. Comparative analyses have found no consistent association between CRISPR activity and rates of gene acquisition (Gophna *et al*., 2015), and in some settings CRISPR immunity can even promote transduction (Watson *et al*., 2018). The co-occurrence of CRISPR-Cas systems and mobile elements observed here should therefore be read as descriptive rather than as evidence of a restrictive effect.

Bacteriocin biosynthetic potential was detected in about 15% of the catalogue and was concentrated in lineages with well-documented antagonistic activity. Lactobacillales bacteriocins dominated in *Lactobacillus* and *Ligilactobacillus*, in line with the established role of lactic acid bacteria as bacteriocin producers in the gut and their activity against poultry pathogens such as *Campylobacter* and *Clostridium perfringens* (Cotter *et al*., 2005; Vieco-Saiz *et al*., 2019). Colicins and microcins were concentrated in *Escherichia*, a long-documented trait of this genus (Cascales *et al*., 2007). Microcin-producing commensal *E. coli* can limit the expansion of competing Enterobacteriaceae, including *Salmonella*, under inflammatory conditions (Sassone-Corsi *et al*., 2016). About one in ten predicted clusters could not be assigned to a characterised structural class, which identifies a concrete target for future genome mining. These predictions are based on sequence homology and indicate genetic potential only. Peptide expression, processing, export and activity cannot be inferred from sequence data alone.

The probiotic screen illustrates how the genomic layers examined here interact in practice. In contrast with what might be expected from genera with a long history of safe

use, exclusion was driven mainly by acquired antimicrobial resistance rather than by virulence, and affected up to one third of the MAGs in some genera. This is consistent with reports of *tet(W)* and *erm(B)* in commensal and commercial lactobacilli and bifidobacteria (Ammor *et al*., 2007). It also reinforces the requirement, central to the qualified presumption of safety framework, that candidate strains be free of acquired resistance to clinically relevant antimicrobials (EFSA BIOHAZ Panel, 2023). The complete exclusion of *Enterococcus* on virulence grounds reflects the long-standing controversy over the safety of this genus. Most importantly, bacteriocin biosynthetic potential was more than twice as frequent among MAGs excluded for resistance as among retained candidates. The genera with the greatest competitive potential, notably *Lactobacillus* and *Ligilactobacillus*, were thus also those most affected by the safety criterion. Genomic safety and competitive potential do not co-vary uniformly, and probiotic selection must balance both. Candidates from next-generation genera such as *Faecalibacterium* and *Akkermansia* lacked bacteriocin potential altogether. Their potential benefit is therefore more likely to rely on other mechanisms, such as butyrate production and barrier reinforcement (Miquel *et al*., 2013). In all cases, genomic candidacy is only a first filter. Translating it into a validated probiotic requires isolation in pure culture, phenotypic confirmation of safety and functional traits, and controlled in vivo trials (Merenstein *et al*., 2023).

Several limitations apply to this work. All results describe genomic potential inferred from MAGs and do not demonstrate gene expression, phenotype or transfer. Binning is known to lose or misassign plasmids and other mobile elements, so mobile resistance and virulence genes are likely underestimated and their host assignments uncertain. The integrated studies differed in sampling, sequencing and assembly, and the catalogue is dominated by a single collection, which limits comparisons among production contexts. Finally, the analyses are based on genome counts rather than on organismal abundance. Several extensions would address these limitations directly. Mapping the original reads to a dereplicated version of the catalogue would provide sample-level abundances and allow proper ecological comparisons. Long-read and Hi-C sequencing would resolve the genomic context and hosts of mobile resistance genes. Culture-based validation would test the safety and antimicrobial activity of the prioritised probiotic candidates. Making the catalogue and its annotations publicly available would allow it to serve as a reference for future genome-resolved surveillance of the chicken gut microbiome.

Conclusions

This study integrated six independent metagenomic datasets from five countries into a uniformly quality-filtered catalogue of 11,224 genomes from the chicken gastrointestinal tract, and annotated each genome for taxonomy, metabolic potential, antimicrobial resistance, mobile genetic elements, virulence, CRISPR-Cas defence, bacteriocin production and probiotic candidacy. The catalogue showed that the taxonomic composition of the chicken gut microbiome varies widely among studies, with more than half of all genera recovered from a single dataset and nearly half of all species lacking a formal description. Broad functional categories, in contrast, remained stable across production contexts. Integration across independent studies is therefore essential to build a representative genomic reference for this ecosystem.

The resistome analysis showed that acquired antimicrobial resistance is common in the chicken gut microbiome, carried by about one in seven genomes, and that it is concentrated in commensal genera rather than in classical pathogens. Acquired resistance genes were strongly associated with insertion sequences, which points to chromosomally integrated mobile elements as a major route of resistance dissemination in this community. Genes of critical clinical relevance were rare but present in almost every dataset. They included resistance to oxazolidinones, tigecycline and glycopeptides, extended-spectrum β-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance genes, and the poultry pathogen *Enterococcus cecorum* carried the highest multidrug-resistance burden in the catalogue. No *mcr* gene or acquired carbapenemase was detected. Because these determinants are typically plasmid-borne and frequently lost during genome binning, their absence cannot be taken as evidence that they are absent from the chicken gut.

Bacteriocin biosynthetic potential was widespread and concentrated in lactic acid bacteria and *Escherichia*. The probiotic screen, however, revealed a trade-off between safety and competitive potential. The genera with the highest bacteriocin potential, notably *Lactobacillus* and *Ligilactobacillus*, were also those most frequently excluded for carrying acquired resistance genes. Genomic screening should therefore consider safety and functional traits jointly, and the candidates prioritised here require experimental validation before any application. All findings describe genomic potential rather than demonstrated phenotypes. Within these limits, the catalogue provides a genome-resolved reference for the surveillance of antimicrobial resistance and for the rational selection of

microbiome-based alternatives to antimicrobials in poultry production.

Methods

Data acquisition and study selection

Publicly available shotgun metagenomic datasets from the gastrointestinal tract of *Gallus gallus domesticus* were identified through searches of PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) and the associated sequence repositories. Studies were included if they provided raw sequencing reads, publicly available MAGs, or both, derived from gastrointestinal samples of commercial chicken lineages. Six studies met these criteria (Table 1), representing different geographic regions, host lineages, intestinal compartments, ages and management conditions (Table 1). For PRJNA598014, which also included litter samples, only cloacal swab samples were retained. Two complementary data streams were used, with no overlap between them. Raw reads were retrieved from the Sequence Read Archive for the two studies that provided only unassembled data (PRJNA684454 and PRJNA598014; 98 runs). Assembled MAGs were retrieved directly for the four studies that had made them publicly available (ICRGGC, PRJNA543206, PRJNA715658 and PRJNA748109; 14,129 MAGs). The MAGs of PRJNA748109 had been reconstructed by the original authors from high-fidelity long-read assemblies.

Read processing, assembly and binning

Raw reads were assessed with FastQC v0.12.1 (https://github.com/s-andrews/FastQC). Adapters and low-quality bases were removed with fastp v0.20.1 (Chen et al., 2018), using default quality thresholds and a minimum read length of 50 bp. Quality-filtered reads from each sequencing run were assembled independently with MEGAHIT v1.2.9 (Li *et al*., 2015). Contigs were binned with MetaBAT v2.12.1 (Kang *et al*., 2019), which clusters contigs on the basis of tetranucleotide composition and coverage, yielding 5,601 MAGs.

Genome quality assessment

The completeness and contamination of all 19,730 MAGs, both *de novo* and public, were estimated with CheckM2 v1.4.0 (Parks *et al*., 2015) using lineage-specific marker sets. MAGs with completeness ≥85% and contamination ≤10% were retained, yielding the final catalogue of 11,224 MAGs. MAGs with completeness ≥90% and

contamination ≤5% were additionally classified as high quality.

Taxonomic classification

Taxonomy was assigned with GTDB-Tk v2.3.2 (Chaumeil *et al*., 2022), by phylogenetic placement in the bacterial and archaeal reference trees. Taxa without validly published names receive provisional alphanumeric or placeholder designations under this framework (Parks *et al*., 2022; Pallen, 2021). Taxonomic composition was summarised as the number and proportion of MAGs per phylum and genus, both for the whole catalogue and per BioProject. The number of distinct genera and species recovered per BioProject, and the number of genera shared among BioProjects, were used as descriptive measures of taxonomic breadth.

Functional annotation and metabolic reconstruction

Each MAG was annotated with Bakta v1.9.1 (Schwengers *et al*., 2021) to predict coding sequences, non-coding RNAs and other genomic features. Orthology-based annotation was performed with EggNOG-mapper v2.1.12 (Cantalapiedra et al., 2021) against EggNOG database v5.0.2, retaining hits with an e-value ≤ 1×10^{-5} and identity ≥ 40%. This step assigned COG functional categories, KEGG Orthology identifiers and Gene Ontology terms. Carbohydrate-active enzymes were annotated with dbCAN3 (Zhang *et al*., 2023) against the CAZy database, and annotations were retained when supported by at least two of the three integrated methods (HMMER, DIAMOND and eCAMI). Metabolic pathway completeness was estimated with KEGG-Decoder (Graham *et al*., 2018) from the KEGG Orthology assignments, calculated for each MAG and summarised per BioProject, genus and phylum.

Antimicrobial resistance gene screening

Antimicrobial resistance determinants were identified with AMRFinderPlus (Feldgarden *et al*., 2021) using the Bakta-predicted protein sequences of each MAG. Only hits with Type = AMR were included in the resistome; hits classified as STRESS (metal and biocide resistance) or VIRULENCE were considered separately. Hits were partitioned into four evidence categories according to the AMRFinderPlus Method field and the nature of the matched reference: (i) Hits detected exclusively by hidden Markov model searches (Method = HMM) indicate membership of a resistance-associated protein family rather than similarity to a curated reference sequence. These were treated as

putative family-level homologues and were not counted as resistance genes. (ii) Hits containing an internal stop codon (Method = INTERNAL_STOP) were treated as putatively non-functional. (iii) Reference-matched hits (EXACT, ALLELE, BLAST and PARTIAL methods) corresponding to species-specific chromosomal determinants were classified as intrinsic. Examples are *blaEC* in *Escherichia coli*, *cblA*, *cepA* and *cfiA* in *Bacteroides*, *blaL1*, *blaL2* and *smeF* in *Stenotrophomonas*, *blaOXA-193* in *Campylobacter*, and core Enterobacterales efflux genes (*acrF*, *emrD*, *mdtM*). (iv) All remaining reference-matched hits were classified as acquired.

Genes of critical clinical or veterinary concern were defined a priori. They comprised extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β-lactamases, acquired carbapenemases, plasmid-mediated quinolone resistance genes (*qnr*), mobile colistin resistance genes (*mcr*), oxazolidinone resistance genes (*optrA*, *poxtA*, *cfr*, *cfr(B)*), tigecycline-inactivating *tet(X)* variants, *vanA*-type glycopeptide resistance, *mecA*, *fosA3* and 16S rRNA methyltransferases. MAGs carrying acquired genes from three or more distinct AMRFinderPlus resistance classes were classified as multidrug-resistant (MDR), following the threshold proposed by Magiorakos *et al*. (2012) and applied here to genotypic data. Because AMRFinderPlus reports combined phenotypes (e.g., lincosamide/macrolide/streptogramin) as a single class, this definition is conservative. The presence of two or more distinct acquired genes on the same contig was recorded as an indicator of genetic linkage. Taxonomic context was assigned to each hit by linking the GTDB-Tk classification of each MAG to the AMRFinderPlus output.

Mobile genetic elements and mobility scoring

Plasmid sequences were identified with geNomad (Camargo *et al*., 2024), with a plasmid score threshold of ≥0.7, and with PlasmidFinder (Carattoli *et al*., 2014). A MAG was considered plasmid-positive if either tool returned a positive call. Insertion sequences were identified with ISEScan (Xie & Tang, 2017) and OASIS (Robinson et al., 2012), and a MAG was considered IS-positive if either tool reported at least one element. Plasmid carriage, IS carriage and acquired resistance gene carriage, as defined above, were combined into a composite mobility score ranging from 0 to 3 per MAG. The score was categorised as None (0), Low (1), Medium (2) or High (3). Because it aggregates presence or absence calls, the score captures the breadth rather than the intensity of mobility evidence within a genome. The association between acquired resistance and each mobility indicator was tested with Fisher's exact test. Its robustness was assessed by

repeating the test after excluding PRJNA748109 and by computing Mantel–Haenszel pooled odds ratios stratified by BioProject and by phylum. The influence of genome quality was assessed by comparing completeness across score categories and with Pearson's correlation.

Virulence factor screening

Virulence-associated genes were identified with ABRicate v1.0.1 (Seemann, 2016) against the Virulence Factor Database (VFDB; Liu et al., 2022; release of 14 January 2025, 2,597 sequences). Hits were retained only when both coverage and identity were ≥80%. Detected genes were grouped according to VFDB functional categories. Virulence genes reported by AMRFinderPlus (Type = VIRULENCE) were examined separately for toxins of relevance to poultry health.

CRISPR-Cas systems and spacer targets

CRISPR arrays were identified with MinCED (Bland *et al*., 2007). CRISPRCasTyper (Russel *et al*., 2020) was then run on all MAGs with at least one array, to detect *cas* genes and classify operons into types and subtypes. A MAG was considered to carry a confirmed CRISPR-Cas system only when a complete, typeable *cas* operon was found in proximity to a CRISPR array. Loci with incomplete *cas* operons were reported separately as putative and were not counted as confirmed systems. Spacer sequences were extracted from all CRISPR arrays detected by MinCED and compared with a viral reference database (IMG/VR) using BLASTn, retaining high-identity matches (mean identity 98.8%). Viral targets were classified according to the taxonomy and genome topology annotations of the reference database.

Bacteriocin biosynthetic gene clusters

Bacteriocin-associated biosynthetic gene clusters were predicted with BAGEL4 (van Heel *et al*., 2018). BAGEL4 reports areas of interest (AOIs) containing core peptide genes together with transport, immunity and modification genes. All AOIs were retained without additional filtering and were assigned to simplified classes derived from the BAGEL4 annotation. Lytic enzymes, which correspond to bacteriolytic proteins rather than ribosomally synthesised bacteriocins, were reported separately and excluded when bacteriocins were considered in the strict sense.

Probiotic candidate screening

Candidate probiotic MAGs were identified through a sequential, exclusion-based screen. MAGs were first restricted to sixteen genera. These comprised traditional probiotic genera with a history of safe use in food and feed (*Lactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Bacillus*) and genera proposed as next-generation probiotics (*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Ruminococcus* and *Akkermansia*). A MAG was then excluded if it met either of two criteria. The first was carriage of at least one acquired resistance gene in a class of clinical or veterinary concern: phenicols, glycopeptides, oxazolidinones, streptogramins, tetracyclines, β-lactams, carbapenems or colistin at class level, or vancomycin, methicillin, carbapenem, colistin, linezolid or tigecycline at subclass level. This criterion is in line with the qualified presumption of safety requirement that strains lack acquired resistance to clinically relevant antimicrobials (EFSA BIOHAZ Panel, 2023). The second was carriage of at least one virulence factor as defined above. The remaining MAGs were retained as candidates and cross-referenced with the bacteriocin catalogue.

Statistical analyses and software

Descriptive summaries and figures were produced in R v4.3.3 (R Core Team, 2024) with ggplot2 (Wickham, 2016). Fisher's exact tests and Mantel-Haenszel odds ratios were computed in Python 3.13 with SciPy v1.18. Significance was set at $\alpha = 0.05$.

Data availability statement

The data supporting this study's findings are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors wish to thank the financial support provided by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant numbers 2023/10686-9 (J.M. Cabrera), and 2018/25511-1 (R.P.d.S.O.)] and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) [grant number CAPES 88887.817742/2023-00 (J.M. Cabrera)]. This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel,

Brazil (CAPES), Finance Code 001.

Authors contributions

AMV and R.P.d.S.O. designed the study, coordinated, and supervised the work. AMV and JMC developed the methodology. JMC analysed the data. JMC wrote the original draft. All authors provided suggestions and revised the manuscript.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

Ammor MS, Flórez AB, Mayo B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol 24:559–570. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001

Bland C, Ramsey TL, Sabree F, Lowe M, Brown K, Kyrpides NC, Hugenholtz P. 2007. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. BMC Bioinformatics 8:209. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-209

Brito IL. 2021. Examining horizontal gene transfer in microbial communities. Nat Rev Microbiol 19:442–453. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00534-7

Camargo AP, Roux S, Schulz F, Babinski M, Xu Y, Hu B, Chain PSG, Nayfach S, Kyrpides NC. 2024. Identification of mobile genetic elements with geNomad. Nat Biotechnol 42:1303–1312. https://doi.org/10.1038/s41587-023-01953-y

Cantalapiedra CP, Hernandez-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J. 2021. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. Mol Biol Evol 38:5825–5829. https://doi.org/10.1093/molbev/msab293

Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother 58:3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14

Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. 2007. Colicin biology. Microbiol Mol Biol Rev 71:158–229. https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06

Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. 2022. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the Genome Taxonomy Database. Bioinformatics 38:5315–5316. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac672

Che Y, Yang Y, Xu X, Břinda K, Polz MF, Hanage WP, Zhang T. 2021. Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. Proc Natl Acad Sci U S A 118:e2008731118. https://doi.org/10.1073/pnas.2008731118

Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 34:i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560

Clavijo V, Flórez MJV. 2018. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. Poult Sci 97:1006–1021. https://doi.org/10.3382/ps/pex359

Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol 3:777–788. https://doi.org/10.1038/nrmicro1273

Crits-Christoph A, Hallowell HA, Koutouvalis K, Suez J. 2022. Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome. Gut Microbes 14:2055944. https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2055944

Culp EJ, Goodman AL. 2023. Cross-feeding in the gut microbiome: ecology and mechanisms. Cell Host Microbe 31:485–499. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.016

Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hoffmann M, Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, Tyson GH, Klimke W. 2021. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. Sci Rep 11:12728. https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0

Feng Y, Wang Y, Zhu B, Gao GF, Guo Y, Hu Y. 2021. Metagenome-assembled genomes and gene catalog from the chicken gut microbiome aid in deciphering antibiotic resistomes. Commun Biol 4:1303. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02827-2

Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes 3:289–306. https://doi.org/10.4161/gmic.19897

Gilroy R, Ravi A, Getino M, Pursley I, Horton DL, Alikhan NF, Baker D, Gharbi K, Hall N, Watson M, Adriaenssens EM, Foster-Nyarko E, Jarju S, Secka A, Antonio M, Oren A, Chaudhuri RR, La Ragione R, Hildebrand F, Pallen MJ. 2021. Extensive microbial diversity within the chicken gut microbiome revealed by metagenomics and culture. PeerJ 9:e10941. https://doi.org/10.7717/peerj.10941

Gophna U, Kristensen DM, Wolf YI, Popa O, Drevet C, Koonin EV. 2015. No evidence of inhibition of horizontal gene transfer by CRISPR–Cas on evolutionary timescales. ISME J 9:2021–2027. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.20

Graham ED, Heidelberg JF, Tully BJ. 2018. Potential for primary productivity in a globally-distributed bacterial phototroph. ISME J 12:1861–1866. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0091-3

Guo W, Li J, Kaltenboeck B, Gong J, Fan W, Wang C. 2016. *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). Sci Rep 6:19638. https://doi.org/10.1038/srep19638

Gupta CL, Blum SE, Kattusamy K, Daniel T, Druyan S, Shapira R, Krifucks O, Zhu YG, Zhou XY, Su JQ, Gilboa N, Meiri H, Gophna U, Bernstein R, Dotan I. 2021. Longitudinal study on the effects of growth-promoting and therapeutic antibiotics on the dynamics of chicken cloacal and litter microbiomes and resistomes. Microbiome 9:178. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01136-4

He T, Wang R, Liu D, Walsh TR, Zhang R, Lv Y, Ke Y, Ji Q, Wei R, Liu Z, Shen Y, Wang G, Sun L, Lei L, Lv Z, Li Y, Pang M, Wang L, Sun Q, Fu Y, Song H, Hao Y, Shen Z, Wang S, Chen G, Wu C, Shen J, Wang Y. 2019. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. Nat Microbiol 4:1450–1456. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2

Józefiak D, Rutkowski A, Martin SA. 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. Anim Feed Sci Technol 113:1–15. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.09.007

Jung A, Chen LR, Suyemoto MM, Barnes HJ, Borst LB. 2018. A review of *Enterococcus cecorum* infection in poultry. Avian Dis 62:261–271. https://doi.org/10.1637/11825-030618-Review.1

Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, Wang Z. 2019. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. PeerJ 7:e7359. https://doi.org/10.7717/peerj.7359

Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. PLoS Pathog 4:e26. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026

Kogut MH, Arsenault RJ. 2016. Editorial: gut health: the new paradigm in food animal production. Front Vet Sci 3:71. https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00071

Lemos LN, de Carvalho FM, Santos FF, Valiatti TB, Corsi DC, de Oliveira Silveira AC, Gerber A, Guimarães APC, de Oliveira Souza C, Brasiliense DM, et al. 2022. Large scale genome-centric metagenomic data from the gut microbiome of food-producing animals and humans. Sci Data 9:366. https://doi.org/10.1038/s41597-022-01465-5

Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics 31:1674–1676. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033

Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. 2022. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res 50:D912–D917. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16:161–168. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Louca S, Polz MF, Mazel F, Albright MBN, Huber JA, O'Connor MI, Ackermann M, Hahn AS, Srivastava DS, Crowe SA, Doebeli M, Parfrey LW. 2018. Function and functional redundancy in microbial systems. Nat Ecol Evol 2:936–943. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18:268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Merenstein D, Pot B, Leyer G, Ouwehand AC, Preidis GA, Elkins CA, Hill C, Lewis ZT, Shane AL, Zmora N, Petrova MI, Collado MC, Morelli L, Montoya GA, Szajewska H,

Tancredi DJ, Sanders ME. 2023. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. Gut Microbes 15:2185034. https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034

Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P. 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. Curr Opin Microbiol 16:255–261. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.003

Moya A, Ferrer M. 2016. Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. Trends Microbiol 24:402–413. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.002

Munk P, Knudsen BE, Lukjancenko O, Duarte ASR, Van Gompel L, Luiken REC, Smit LAM, Schmitt H, Garcia AD, Hansen RB, Petersen TN, Bossers A, Ruppé E, EFFORT Group, Lund O, Hald T, Pamp SJ, Vigre H, Heederik D, Wagenaar JA, Mevius D, Aarestrup FM. 2018. Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. Nat Microbiol 3:898–908. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9

Naemi AO, Dey H, Kiran N, Sandvik ST, Slettemeås JS, Nesse LL, Simm R. 2020. NarAB is an ABC-type transporter that confers resistance to the polyether ionophores narasin, salinomycin, and maduramicin, but not monensin. Front Microbiol 11:104. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00104

Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ, Cox NA. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. FEMS Microbiol Lett 360:100–112. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608

Pallen MJ. 2021. Bacterial systematics in the genomic era. FEMS Microbiol Lett 368:fnab134. https://doi.org/10.1093/femsle/fnab134

Parks DH, Chuvochina M, Chaumeil PA, Rinke C, Mussig AJ, Hugenholtz P. 2022. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalised and complete genome-based taxonomy. Nucleic Acids Res 50:D785–D794. https://doi.org/10.1093/nar/gkab776

Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res 25:1043–1055. https://doi.org/10.1101/gr.186072.114

Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. 2017. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. Immunol Rev 279:70–89. https://doi.org/10.1111/imr.12567

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464:59–65. https://doi.org/10.1038/nature08821

R Core Team. 2024. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/

Robinson DG, Lee MC, Marx CJ. 2012. OASIS: an automated program for global investigation of bacterial and archaeal insertion sequences. Nucleic Acids Res 40:e174. https://doi.org/10.1093/nar/gks778

Russel J, Pinilla-Redondo R, Mayo-Muñoz D, Shah SA, Sørensen SJ. 2020. CRISPRCasTyper: automated identification, annotation, and classification of CRISPR-Cas loci. CRISPR J 3:462–469. https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0059

Sassone-Corsi M, Nuccio SP, Liu H, Hernandez D, Vu CT, Takahashi AA, Edwards RA, Raffatellu M. 2016. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. Nature 540:280–283. https://doi.org/10.1038/nature20557

Schwarz S, Zhang W, Du XD, Krüger H, Feßler AT, Ma S, Zhu Y, Wu C, Shen J, Wang Y. 2021. Mobile oxazolidinone resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev 34:e00188-20. https://doi.org/10.1128/CMR.00188-20

Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. 2021. Bakta: rapid and standardised annotation of bacterial genomes via a comprehensive database. Microb Genom 7:000685. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685

Seemann T. 2016. ABRicate: mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes. https://github.com/tseemann/abricate

Segura-Wang M, Grabner N, Koestelbauer A, Klose V, Ghanbari M. 2021. Genome-resolved metagenomics of the chicken gut microbiome. Front Microbiol 12:726923. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726923

Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan TA, Bedford MR, Penn CW, Pallen MJ. 2014. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. PLoS One 9:e91941. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941

Sørum M, Johnsen PJ, Aasnes B, Rosvoll T, Kruse H, Sundsfjord A, Simonsen GS. 2006. Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcin. Appl Environ Microbiol 72:516–521. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.516-521.2006

Stalder T, Press MO, Sullivan S, Liachko I, Top EM. 2019. Linking the resistome and plasmidome to the microbiome. ISME J 13:2437–2446. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0446-4

Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. Appl Microbiol Biotechnol 98:4301–4310. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5646-2

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature 457:480–484. https://doi.org/10.1038/nature07540

van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers OP. 2018. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. Nucleic Acids Res 46:W278–W281. https://doi.org/10.1093/nar/gky383

Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, Drider D. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Front Microbiol 10:57. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057

Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Millman KJ, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey CJ, Polat I, Feng Y, Moore EW, VanderPlas J, Laxalde D, Perktold J, Cimrman R, Henriksen I, Quintero EA, Harris CR, Archibald AM, Ribeiro AH, Pedregosa F, van Mulbregt P, SciPy 1.0 Contributors. 2020. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. Nat Methods 17:261–272. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2

Watson BNJ, Staals RHJ, Fineran PC. 2018. CRISPR-Cas-mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction. mBio 9:e02406-17. https://doi.org/10.1128/mBio.02406-17

Wickham H. 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, New York.

Xie Z, Tang H. 2017. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. Bioinformatics 33:3340–3347. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx433

Xiong W, Wang Y, Sun Y, Ma L, Zeng Q, Jiang X, Li A, Zeng Z, Zhang T. 2018. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the

incidence of antibiotic resistance genes. Microbiome 6:34. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0419-2

Zhang Y, Jiang F, Yang B, Wang S, Wang H, Wang A, Xu D, Fan W. 2022. Improved microbial genomes and gene catalog of the chicken gut from metagenomic sequencing of high-fidelity long reads. Gigascience 11:giac116. https://doi.org/10.1093/gigascience/giac116

Zheng J, Ge Q, Yan Y, Zhang X, Huang L, Yin Y. 2023. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. Nucleic Acids Res 51:W115–W121. https://doi.org/10.1093/nar/gkad328

Tables

Table 1. Metagenomic studies integrated into the genome catalogue.

Study	Accession	Data used	Geographical Region	GI Tract Region	Host Lineage	Age at Sampling	Diet	Antibiotic Use
Lemos *et al.*	PRJNA684454	87 SRA runs	Brazil	Caecum, faeces	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Zhang *et al.*	PRJNA748109	748 public MAGs (long-read assemblies)	China	Duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon	Lingnan yellow broiler	42 days (slaughter)	Not reported	Not reported
Feng *et al.*	ICRGGC	12,339 public MAGs	China	Faeces, caeca, mixed GI tract	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported
Gilroy *et al.*	PRJNA543206	887 public MAGs	United Kingdom	Faeces	Lohmann Brown, Silkie	Adult	Commercial standard (layer)	Not reported
Gupta *et al.*	PRJNA598014	11 SRA runs	Israel	Cloaca swabs†	Ross 308	0-41 days	Commercial standard (broiler)	Yes‡
Segura-Wang *et al.*	PRJNA715658	155 public MAGs	Austria	Ileum, caecum, colon (mucosa and digesta)	Ross 308	3, 14, 21, 35 days	Maize-soybean (variable proportions by age)	Not reported

SRA, Sequence Read Archive; MAGs, metagenome-assembled genomes; GI, gastrointestinal. †Litter bedding samples were also collected in this study but excluded from analysis to ensure consistency with gastrointestinal-derived material. ‡Antimicrobial treatments included bacitracin, enrofloxacin, and bacitracin combined with enrofloxacin; a negative control group was also maintained.

Table 2. Genome recovery, quality and taxonomic breadth per BioProject.

BioProject	SRA Entries	Public MAGs	Completeness			Contamination	Total Genomes	Complete Genomes
			≥85 - <90%	≥90 - <100%	100%	0%		
ICRGGC	0	12,339	3,092	5,804	137	1,048	9,033	58
PRJNA543206	50	887	184	516	14	128	714	8
PRJNA598014	11	0	34	131	5	8	170	1
PRJNA684454	87	0	73	559	42	65	672	8
PRJNA715658	751	155	32	101	2	21	135	1
PRJNA748109	9	748	26	432	35	173	500	5
Total	**908**	**14,129**	**3,441**	**7,543**	**235**	**1,443**	**11,224**	**81**

SRA, Sequence Read Archive; HQ, high quality; QC, quality control. Quality thresholds applied: completeness ≥85% and contamination ≤10%, assessed using CheckM v1.4.0. SRA entries represent individual sequencing runs retrieved from the Sequence Read Archive; for BioProjects with both SRA entries and public MAGs, the two data streams were integrated without overlap. The total MAGs prior to quality filtering (19,730) includes 5,601 MAGs assembled *de novo* from SRA entries combined with 14,129 publicly available MAGs; values shown reflect MAGs retained after quality filtering per BioProject.

Table 3. Antimicrobial resistance hits and acquired resistance across BioProjects.

BioProject	AMR hits	Acquired hits	% acquired	MAGs with acquired genes	MDR MAGs
ICRGGC	8,361	1,786	21.4	929	130
PRJNA543206	715	104	14.5	58	9
PRJNA748109	3,043	2,480	81.5	410	270
PRJNA715658	132	7	5.3	4	0
PRJNA684454	1,314	242	18.4	111	24
PRJNA598014	137	43	31.4	21	4
Total	**13,702**	**4,662**	**34.0**	**1,533**	**437**

AMR hits include all AMRFinderPlus hits with Type = AMR. Acquired hits exclude HMM-only, internal-stop and intrinsic hits. MDR, multidrug-resistant (acquired genes from three or more resistance classes).

Table 4. Genes of critical clinical or veterinary concern detected in the catalogue.

Gene	Resistance	MAGs	Main assigned taxa
poxtA	Oxazolidinones, phenicols	14	*Lactobacillus gallinarum*, *L. crispatus*
cfr(B)	Oxazolidinones, phenicols, lincosamides	10	Bacillota, Bacillota_A
optrA	Oxazolidinones, phenicols	6	*Ligilactobacillus salivarius*, *Enterococcus_E cecorum*
cfr	Oxazolidinones, phenicols, lincosamides	3	Bacillota_A, *L. salivarius*
tet(X1), *tet(X2)*, *tet(X5)*	Tigecycline	24	*Bacteroides*, Flavobacteriaceae
npmA	Aminoglycosides (high level)	14	*Faecalibacterium*, *Gemmiger*

mecA	β-lactams (methicillin)	2	*Mammaliicoccus lentus*
vanA operon	Glycopeptides	2	Uncertain*
blaCTX-M-14	Extended-spectrum cephalosporins	1	Enterobacteriaceae
blaDHA	Cephalosporins (AmpC)	2	*Morganella morganii*; uncertain*
qnrS1, *qnrB19*	Fluoroquinolones	2	Uncertain*
fosA3	Fosfomycin	1	Bacillota_A
mcr	Colistin	0	—

**Host assignments that do not match the usual hosts of these genes (e.g.,* Bacteroides xylanisolvens *for* vanA*,* Phascolarctobacterium faecium *for* qnrS1 *and* blaDHA-1*) may reflect the binning of mobile-element contigs into unrelated genomes.

Figures



Figure 1. Geographic distribution of integrated metagenomic datasets. World map showing the geographic origins of the six BioProjects integrated in this study. Each pin represents the country of origin of a BioProject, colour-coded by study. Labels indicate the BioProject accession number, sampling country, gastrointestinal sampling site, host lineage, age at sampling, dietary context, and antimicrobial exposure status. ATBs, antibiotics.

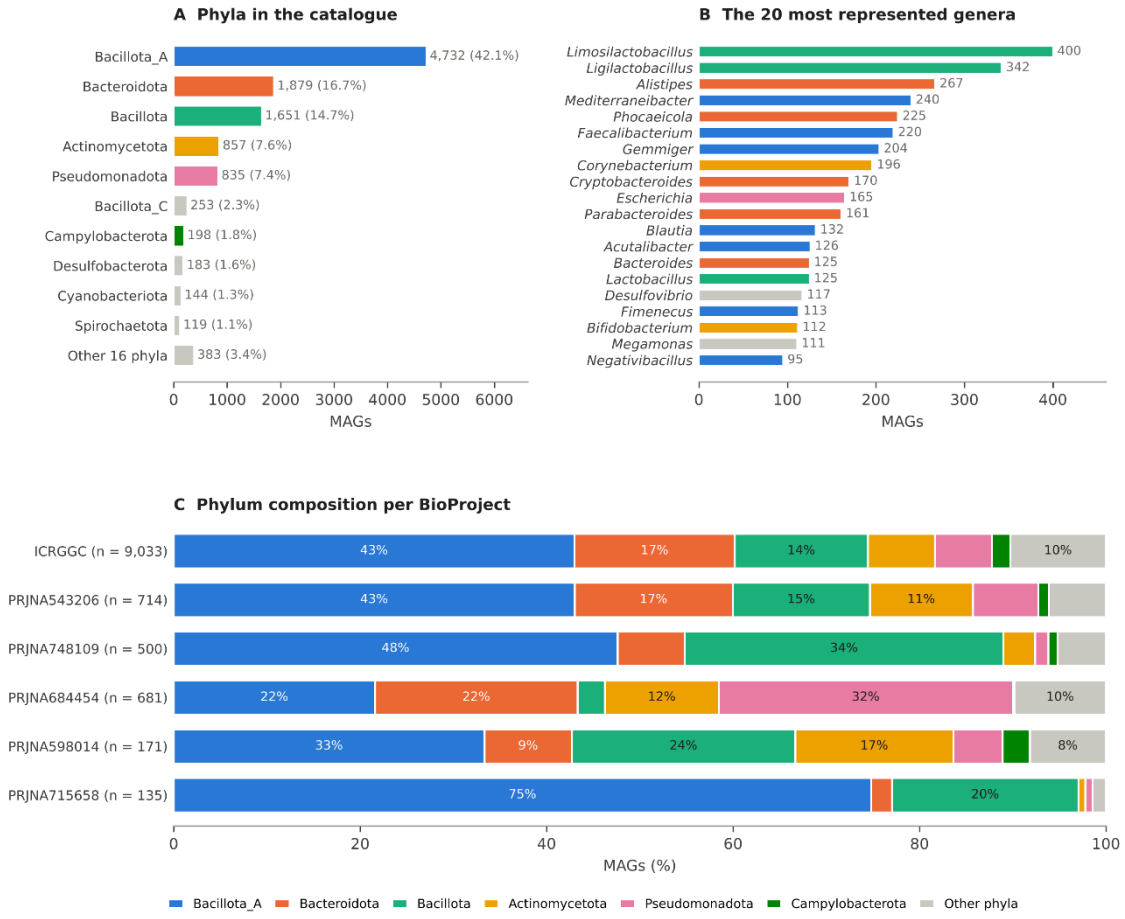


Figure 2. Taxonomic composition of the genome catalogue. (A) Number of MAGs per phylum. (B) The 20 most represented genera, coloured by phylum. (C) Phylum composition of MAGs per BioProject.

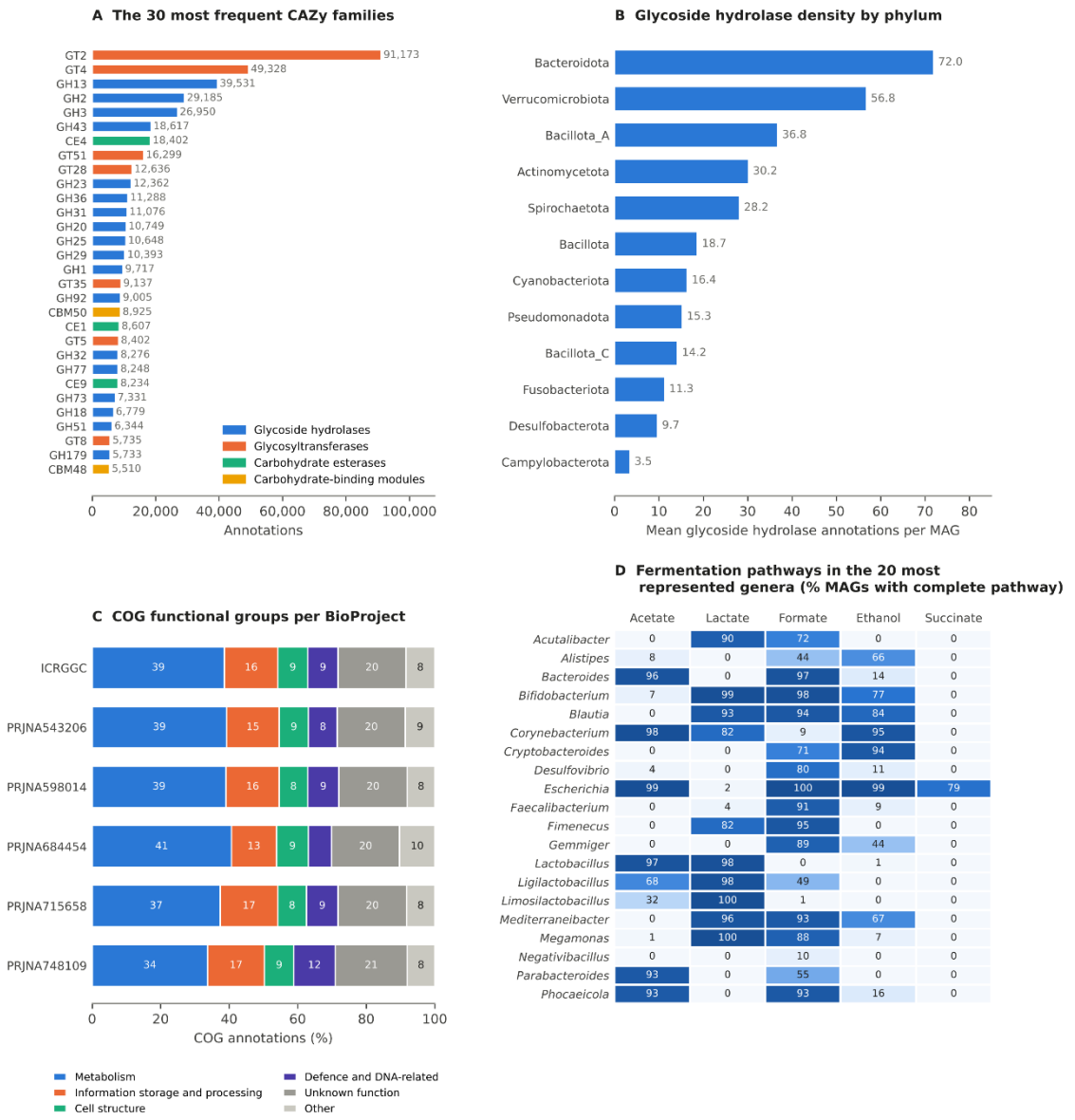


Figure 3. Functional potential of the catalogue. (A) The 30 most frequent carbohydrate-active enzyme families (dbCAN3, supported by at least two methods), coloured by CAZy class. (B) Mean number of glycoside hydrolase annotations per MAG in phyla with at least ten MAGs. (C) Distribution of COG functional groups per BioProject. (D) Proportion of MAGs with ≥75% completeness for selected fermentation pathways in the 20 most represented genera (KEGG-Decoder); ethanol refers to the acetate-to-acetaldehyde step. Two further pathways (acetaldehyde to ethanol, and formate to CO_2 and H_2) were not complete in any of these genera and are not shown.

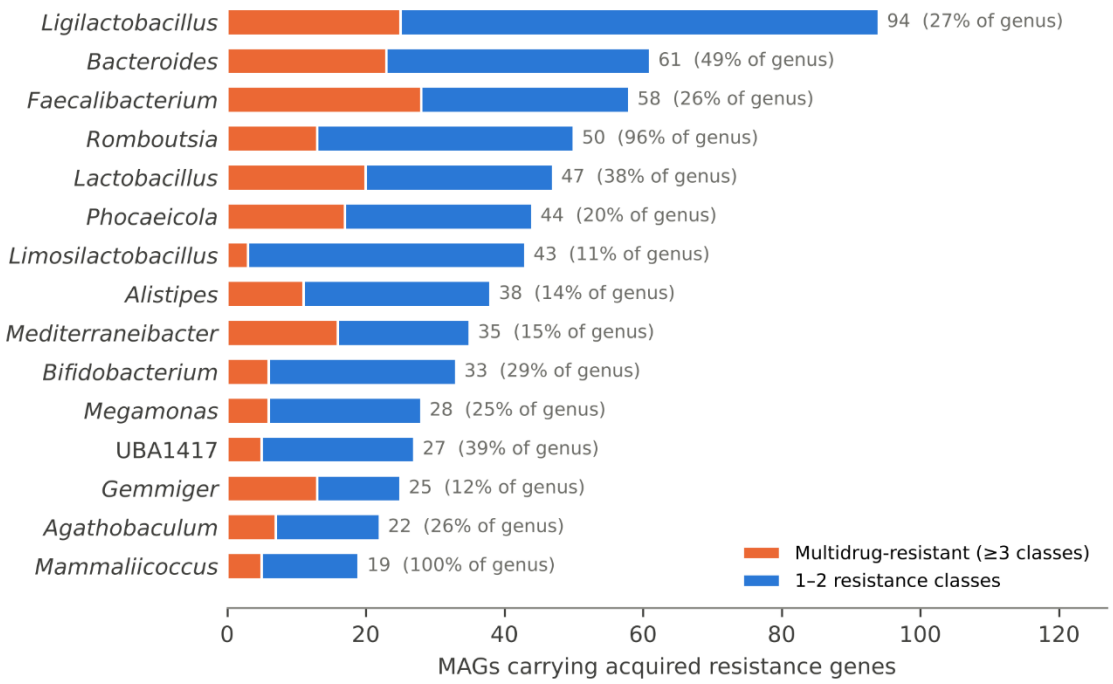


Figure 4. Acquired antimicrobial resistance across genera. Number of MAGs carrying acquired resistance genes in the 15 most affected genera, divided into multidrug-resistant MAGs (acquired genes from three or more resistance classes) and MAGs with genes from one or two classes. Values beside each bar give the number of affected MAGs and their proportion of all MAGs of the genus.

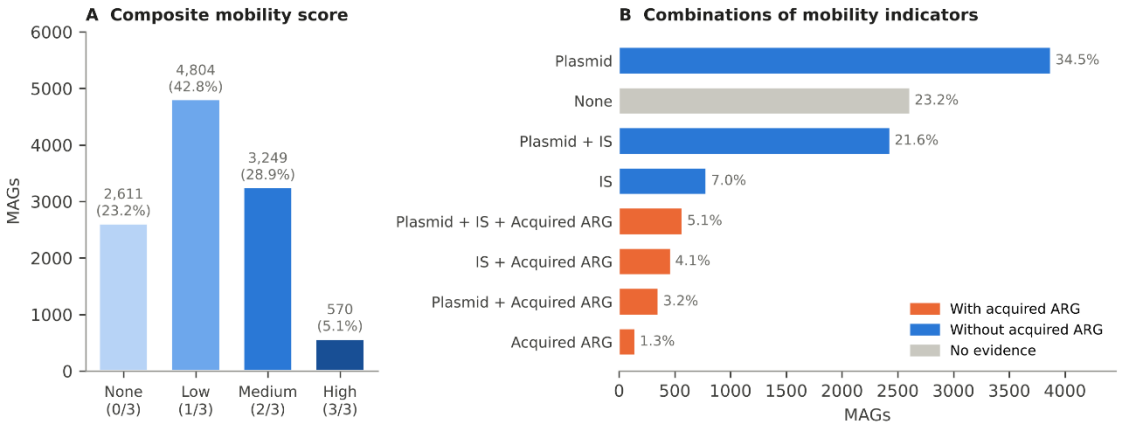


Figure 5. Composite mobility score. (A) Number of MAGs per score category (None, Low, Medium, High). (B) Frequency of each combination of plasmid, insertion sequence and acquired resistance gene carriage.

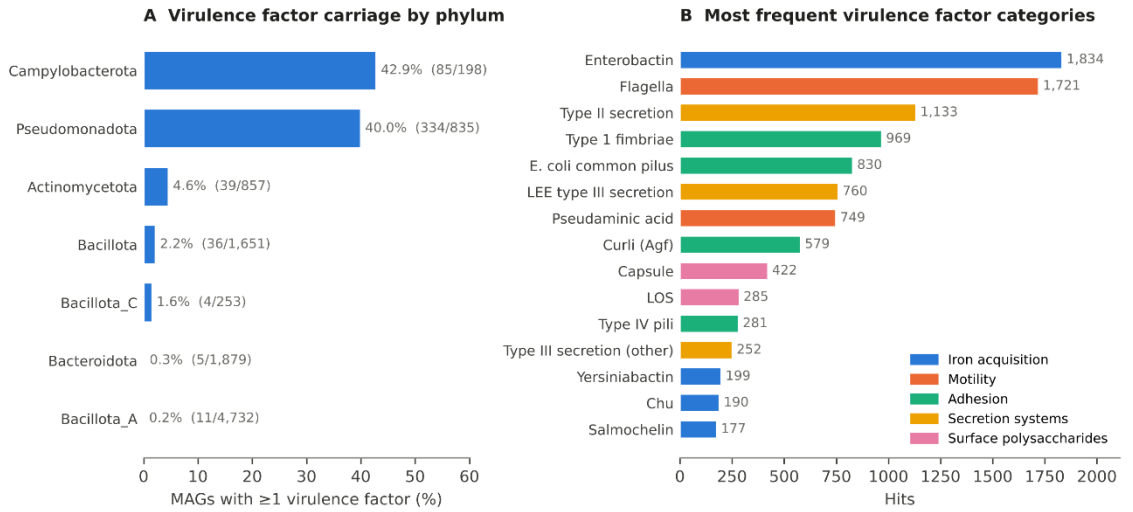


Figure 6. Virulence factor categories by phylum (VFDB; coverage and identity ≥80%). (A) Proportion of MAGs carrying at least one virulence factor in each phylum with virulence hits. (B) The 15 most frequent virulence factor categories, coloured by functional group; categories represented by more than one VFDB entry were merged.

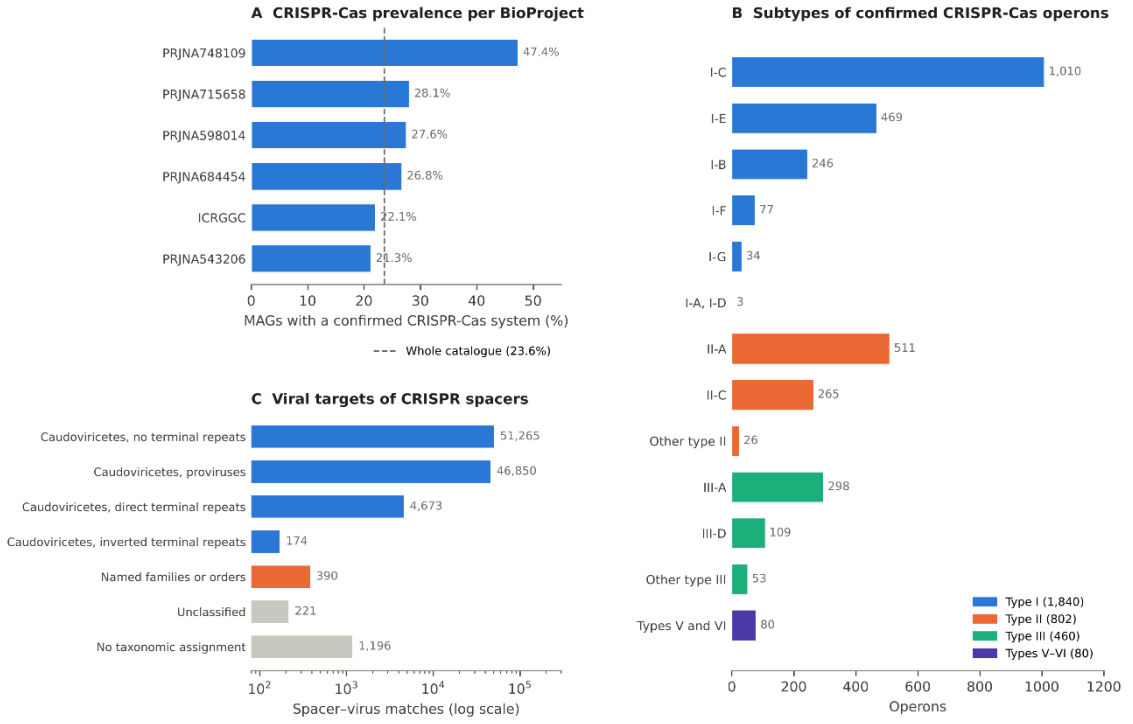


Figure 7. CRISPR-Cas systems in the genome catalogue. (A) Proportion of MAGs with a confirmed CRISPR-Cas system per BioProject; the dashed line indicates the catalogue-wide value. (B) Number of confirmed operons per subtype, coloured by type. (C) Number of spacer–virus matches per viral group (logarithmic scale).

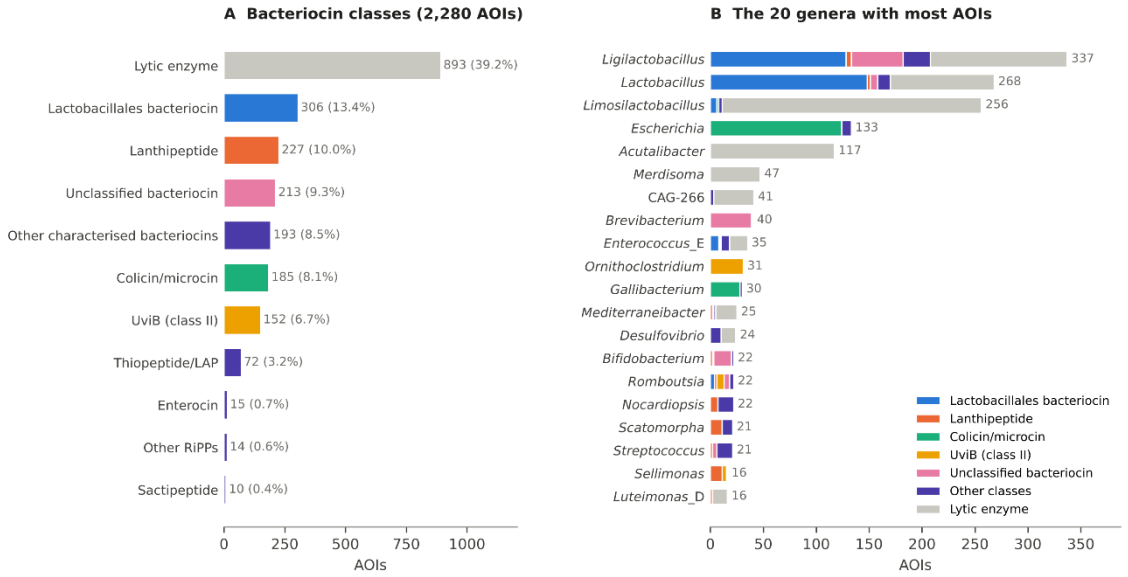


Figure 8. Bacteriocin biosynthetic gene clusters predicted by BAGEL4. (A) Number of AOIs per class. (B) The 20 genera with the most AOIs, coloured by class.

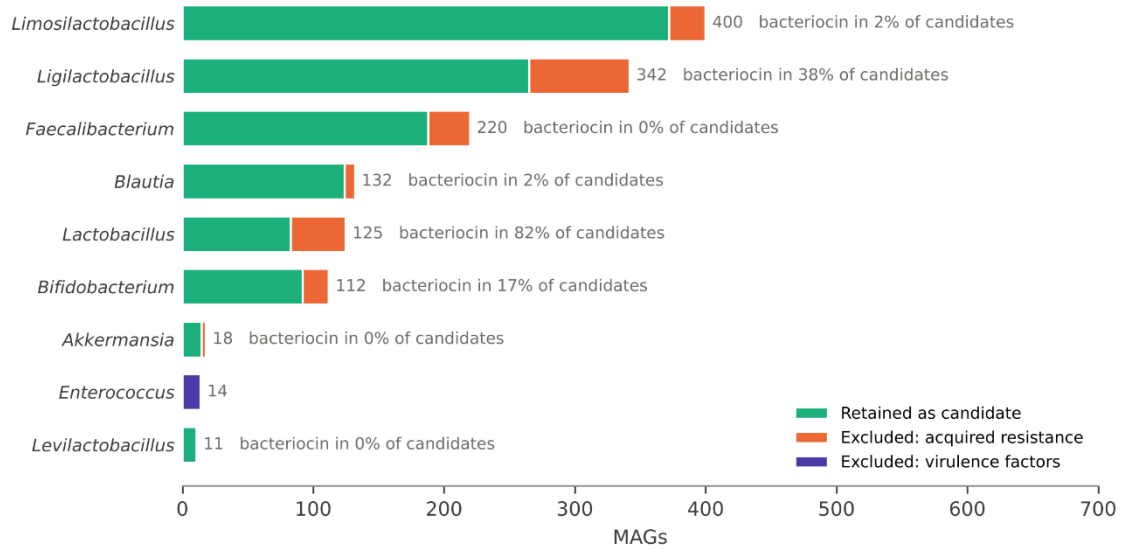


Figure 9. Genomic screening of probiotic candidates. Number of MAGs per genus (genera with ≥10 MAGs) retained as candidates or excluded for carrying acquired resistance genes of clinical or veterinary concern or virulence factors. Values beside each bar give the total number of MAGs and the proportion of candidates carrying bacteriocin gene clusters in the strict sense (excluding lytic enzymes).

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

1. SÍNTESE DO TRABALHO

Esta tese teve como objetivo construir e caracterizar um catálogo de genomas da microbiota gastrointestinal de aves comerciais a partir da integração de dados metagenômicos públicos. Seis estudos independentes, conduzidos em cinco países de três continentes, foram reunidos sob um mesmo critério de qualidade e um mesmo fluxo de anotação. O resultado foi um catálogo de 11.224 genomas montados a partir de metagenomas (MAGs), anotados quanto à taxonomia, ao potencial metabólico, ao resistoma, ao mobiloma, aos fatores de virulência, aos sistemas CRISPR-Cas, à produção de bacteriocinas e ao potencial probiótico. Mais do que descrever uma comunidade específica, o trabalho buscou oferecer um recurso de referência no qual cada característica de interesse pode ser rastreada até a linhagem, o estudo e o contexto de produção em que ocorre.

2. Principais resultados

O catálogo abrangeu 26 filos, 829 gêneros e 1.977 espécies, com predomínio de Bacillota_A, Bacteroidota e Bacillota. Essa visão geral, no entanto, esconde uma grande heterogeneidade entre os estudos integrados. A proporção de Bacteroidota variou de 2% a 22% dos MAGs, e o conjunto de dados brasileiro foi dominado por Pseudomonadota. Apenas dois gêneros foram recuperados nos seis estudos, e mais da metade dos gêneros apareceu em um único. Além disso, quase metade das espécies não possui descrição formal, e essa diversidade ainda não descrita concentra-se em filos pouco representados nos bancos de referência. Com seis estudos, não foi possível separar os efeitos biológicos (linhagem, idade, dieta, segmento intestinal) dos metodológicos (tipo de amostra, tecnologia de sequenciamento, estratégia de montagem). Ficou claro, porém, que nenhum estudo isolado representa a diversidade da microbiota aviária, o que justifica a abordagem integrativa adotada.

Em contraste com a variação taxonômica, o potencial funcional mostrou-se conservado no nível das grandes categorias. A distribuição dos grupos COG variou apenas alguns pontos percentuais entre os estudos, o que é compatível com a redundância funcional descrita em outras microbiotas. Em resolução genômica, contudo, surgiram diferenças relevantes entre linhagens. Bacteroidota apresentou cerca do dobro de glicosídeo-hidrolases por genoma em relação a Bacillota_A, com enriquecimento de

famílias ligadas à degradação de glicanos do hospedeiro. A completude das vias de biossíntese de aminoácidos também variou amplamente, e alguns gêneros pouco abundantes, como *Rothia* e *Catenibacillus*, destacaram-se pelo potencial fermentativo e vitamínico.

A caracterização do resistoma mostrou que é essencial distinguir genes de resistência caracterizados de homólogos distantes de famílias proteicas. Com esse critério, genes de resistência adquiridos foram encontrados em 13,7% dos MAGs, e 3,9% apresentaram genes de três ou mais classes de antimicrobianos. Predominaram genes de resistência a tetraciclinas, aminoglicosídeos e macrolídeos-lincosamidas-estreptograminas, concentrados em gêneros comensais como *Ligilactobacillus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* e *Lactobacillus*. O patógeno aviário *Enterococcus cecorum* apresentou a maior carga de multirresistência do catálogo. Genes de importância crítica foram raros (0,68% dos MAGs), mas estiveram presentes em cinco dos seis estudos. Entre eles estão genes de resistência a oxazolidinonas (*optrA*, *poxtA*, *cfr*), à tigeciclina (*tet(X)*) e aos glicopeptídeos (operon *vanA* completo), além de *mecA*, *blaCTX-M-14* e genes *qnr*. Nenhum gene *mcr* nem carbapenemase adquirida foi detectado. Esse resultado deve ser interpretado com cautela, porque esses genes costumam estar em plasmídeos, que são frequentemente perdidos durante a reconstrução dos genomas.

A análise do mobiloma revelou uma associação forte entre genes de resistência adquiridos e sequências de inserção: genomas com genes adquiridos tiveram cerca de quatro vezes mais chance de carregar esses elementos. A associação se manteve após a exclusão do conjunto de leitura longa e após a estratificação por estudo e por filo. Plasmídeos, por outro lado, não foram mais frequentes nesses genomas. Isso sugere que, na comunidade comensal, elementos integrados ao cromossomo têm papel importante na disseminação da resistência, embora as limitações na detecção de plasmídeos em MAGs também contribuam para esse padrão.

Os fatores de virulência ficaram restritos a 4,6% dos MAGs e concentrados em Pseudomonadota e Campylobacterota. Predominaram sistemas de captação de ferro, flagelos, fímbrias e sistemas de secreção, que indicam potencial de colonização mais do que patogenicidade propriamente dita. Também foram detectados genes de toxinas relevantes para a avicultura, como os de *Clostridium perfringens*. Os sistemas CRISPR-Cas confirmados estiveram presentes em 23,6% dos MAGs, com predomínio do tipo I, e seus espaçadores tiveram como alvo principalmente bacteriófagos caudados, muitos deles

integrados a genomas bacterianos. Esse resultado indica que a predação por fagos é uma pressão seletiva constante no intestino das aves.

Por fim, agrupamentos gênicos de bacteriocinas foram encontrados em 14,8% dos MAGs, concentrados em bactérias láticas e em *Escherichia*. Na triagem probiótica, a exclusão deveu-se principalmente à resistência adquirida, e não à virulência: 210 dos 1.379 MAGs pertencentes a gêneros probióticos foram excluídos por carregar genes de resistência a antimicrobianos de interesse clínico ou veterinário. O achado mais relevante foi um conflito entre segurança e potencial competitivo. Os gêneros com maior potencial de produção de bacteriocinas, especialmente *Lactobacillus* e *Ligilactobacillus*, foram também os mais afetados pelo critério de segurança. O potencial de bacteriocinas foi mais frequente entre os MAGs excluídos do que entre os candidatos mantidos.

3. Avaliação da hipótese

A hipótese da tese foi confirmada apenas em parte. A primeira parte, de que a arquitetura funcional seria conservada apesar da variação taxonômica, foi sustentada pelos resultados. A segunda parte previa que os determinantes de risco estariam concentrados em linhagens específicas, enquanto os traços competitivos e defensivos estariam amplamente distribuídos. Ela se confirmou para os fatores de virulência, para os sistemas CRISPR-Cas e para as bacteriocinas, mas não para a resistência antimicrobiana. Os genes de resistência adquiridos mostraram-se disseminados em gêneros comensais de vários filos, inclusive em gêneros tradicionalmente considerados probióticos. Por fim, a priorização genômica de candidatos probióticos foi possível, mas revelou que segurança e potencial competitivo nem sempre caminham juntos. Por isso, a seleção de candidatos precisa considerar esses dois aspectos ao mesmo tempo.

4. Limitações

Os resultados desta tese descrevem potencial genômico, e não fenótipos. A presença de um gene não demonstra sua expressão, sua atividade ou sua transferência entre bactérias. A reconstrução de genomas a partir de metagenomas tende a perder ou atribuir de forma incorreta os plasmídeos e outros elementos móveis. Por isso, genes de resistência e de virulência associados a esses elementos provavelmente estão subestimados, e a atribuição de seus hospedeiros é incerta. Os estudos integrados diferiram em amostragem, sequenciamento e montagem, e um único conjunto respondeu por cerca de 80% dos genomas, o que limita as comparações entre contextos de produção.

Além disso, as análises basearam-se no número de genomas recuperados, e não na abundância dos organismos nas amostras originais. Por fim, a ausência de metadados padronizados sobre desempenho zootécnico e estado sanitário das aves impediu avaliar a relação entre a microbiota e esses desfechos, uma questão originalmente prevista no projeto.

5. Perspectivas e implicações para a avicultura

Os resultados abrem caminhos concretos para trabalhos futuros. O mapeamento das leituras originais contra uma versão desreplicada do catálogo permitiria estimar a abundância de cada genoma por amostra e realizar comparações ecológicas adequadas entre sistemas de produção. O sequenciamento por leitura longa e as técnicas de Hi-C permitiriam resolver o contexto genômico dos genes de resistência móveis e confirmar se *mcr* e carbapenemases estão de fato ausentes. O isolamento e a caracterização *in vitro* e *in vivo* dos candidatos probióticos priorizados, sobretudo daqueles que combinam ausência de resistência adquirida e potencial de produção de bacteriocinas, são o passo necessário para transformar o potencial genômico em aplicação prática. A integração de dados de desempenho zootécnico e sanitário em estudos futuros também permitiria responder à questão de como a microbiota se relaciona com a saúde e a produtividade das aves.

Para a avicultura, o trabalho traz três mensagens principais. A primeira é que a microbiota comensal das aves é um reservatório relevante de genes de resistência, inclusive de genes de importância crítica para a saúde humana, o que reforça a importância do uso prudente de antimicrobianos e da vigilância em uma perspectiva de Saúde Única. A segunda é que *Enterococcus cecorum* merece atenção específica na vigilância da resistência em frangos de corte. A terceira é que a seleção de probióticos deve incluir uma triagem genômica de segurança, já que gêneros tradicionalmente considerados seguros podem carregar genes de resistência adquiridos. Disponibilizado publicamente, o catálogo construído nesta tese pode servir de referência para essas aplicações e para futuros estudos da microbiota aviária.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995. DOI: https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995.

AMMOR, M. S.; FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, v. 24, n. 6, p. 559-570, 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001.

APAJALAHTI, J.; VIENOLA, K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. Animal Feed Science and Technology, v. 221, p. 323-330, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório anual 2023. São Paulo: ABPA, 2023. Disponível em: https://abpa-br.org/relatorio-anual/. Acesso em: 15 jan 2025.

BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1138140.

BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition — their current value and future benefits. Animal Feed Science and Technology, v. 86, n. 1-2, p. 1-13, 2000. DOI: https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00155-3.

BIKARD, D.; BARRANGOU, R. Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. Current Opinion in Microbiology, v. 37, p. 155-160, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.08.005.

BINDA, C. et al. Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. Digestive and Liver Disease, v. 50, n. 5, p. 421-428, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012.

BOWERS, R. M. et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. Nature Biotechnology, v. 35, n. 8, p. 725-731, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/nbt.3893.

BROWN, J. R. Ancient horizontal gene transfer. Nature Reviews Genetics, v. 4, n. 2, p. 121-132, 2003. DOI: https://doi.org/10.1038/nrg1000.

CABRERA, J.; MONTE, D. Microbiota, microbiome. Emerging Infectious Diseases, v. 30, n. 8, p. 1663, 2024. DOI: https://doi.org/10.3201/eid3008.230677.

CASCALES, E. et al. Colicin biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 71, n. 1, p. 158-229, 2007. DOI: https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. Poultry Science, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007. DOI: https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249.

CHE, Y. et al. Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 118, n. 6, e2008731118, 2021. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2008731118.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro1273.

CRITS-CHRISTOPH, A. et al. Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome. Gut Microbes, v. 14, n. 1, 2055944, 2022. DOI: https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2055944.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poultry Science, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005. DOI: https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634.

DING, J. et al. Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens. Frontiers in Microbiology, v. 8, p. 1967, 2017. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01967.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (EFSA BIOHAZ PANEL). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 17: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2022. EFSA Journal, v. 21, n. 1, e07746, 2023. DOI: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7746.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. EMA/184855/2017. [S. l.]: EMA, 2017. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2015_en.pdf. Acesso em: 20 jan 2025.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April – 1 May 2002. London, Ontario: FAO/WHO, 2002.

FELDGARDEN, M. et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and

virulence. Scientific Reports, v. 11, 12728, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0.

FENG, Y. et al. Metagenome-assembled genomes and gene catalog from the chicken gut microbiome aid in deciphering antibiotic resistomes. Communications Biology, v. 4, 1303, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s42003-021-02827-2.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 61, n. 2, p. 136-169, 1997. DOI: https://doi.org/10.1128/mmbr.61.2.136-169.1997.

FLINT, H. J. et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes, v. 3, n. 4, p. 289-306, 2012. DOI: https://doi.org/10.4161/gmic.19897.

FLOREZ-CUADRADO, D. et al. Antimicrobial resistance in the food chain in the European Union. Advances in Food and Nutrition Research, v. 86, p. 115-136, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Food outlook: biannual report on global food markets. Rome: FAO, 2023. DOI: https://doi.org/10.4060/cc8694en.

FRANZOSA, E. A. et al. Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. Nature Reviews Microbiology, v. 13, n. 6, p. 360-372, 2015. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro3451.

FROST, L. S. et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nature Reviews Microbiology, v. 3, n. 9, p. 722-732, 2005. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro1235.

GADDE, U. et al. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. Animal Health Research Reviews, v. 18, n. 1, p. 26-45, 2017. DOI: https://doi.org/10.1017/S1466252316000207.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995. DOI: https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401.

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present, and future. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 78, n. 2, p. 257-277, 2014. DOI: https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13.

GILROY, R. et al. Extensive microbial diversity within the chicken gut microbiome revealed by metagenomics and culture. PeerJ, v. 9, e10941, 2021. DOI: https://doi.org/10.7717/peerj.10941.

GLENDINNING, L. et al. Assembly of hundreds of novel bacterial genomes from the chicken caecum. Genome Biology, v. 21, 34, 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13059-020-1947-1.

GOPHNA, U. et al. No evidence of inhibition of horizontal gene transfer by CRISPR-Cas on evolutionary timescales. The ISME Journal, v. 9, n. 9, p. 2021-2027, 2015. DOI: https://doi.org/10.1038/ismej.2015.20.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998. DOI: https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9.

HE, T. et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. Nature Microbiology, v. 4, n. 9, p. 1450-1456, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2.

HERMANS, D. et al. A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent Campylobacter jejuni colonization in the chicken gut. Critical Reviews in Microbiology, v. 38, n. 1, p. 17-29, 2012. DOI: https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.615298.

HILLE, F. et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. Cell, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032.

HILLMANN, B. et al. Evaluating the information content of shallow shotgun metagenomics. mSystems, v. 3, n. 6, p. e00069-18, 2018. DOI: https://doi.org/10.1128/mSystems.00069-18.

HUERTA-CEPAS, J. et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. Nucleic Acids Research, v. 47, n. D1, p. D309-D314, 2019. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gky1085.

JOSEPH, T. A.; PE'ER, I. An introduction to whole-metagenome shotgun sequencing studies. In: SHOMRON, N. (ed.). Deep Sequencing Data Analysis. Methods in Molecular Biology, v. 2243. New York: Humana, 2021. p. 107-121. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1103-6_6.

JØRGENSEN, S. L. et al. Diversity and population overlap between avian and human Escherichia coli belonging to sequence type 95. mSphere, v. 4, n. 1, p. e00333-18, 2019. DOI: https://doi.org/10.1128/mSphere.00333-18.

JUNG, A. et al. A review of Enterococcus cecorum infection in poultry. Avian Diseases, v. 62, n. 3, p. 261-271, 2018. DOI: https://doi.org/10.1637/11825-030618-Review.1.

KANEHISA, M. et al. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. Nucleic Acids Research, v. 49, n. D1, p. D545-D551, 2021. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro818.

KERS, J. G. et al. Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 235, 2018. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235.

KUBASOVA, T. et al. Intestinal microbiota of newly hatched chicks and the influence of hatching box environment. Frontiers in Veterinary Science, v. 6, p. 105, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00105.

LEINONEN, R.; SUGAWARA, H.; SHUMWAY, M.; INTERNATIONAL NUCLEOTIDE SEQUENCE DATABASE COLLABORATION. The Sequence Read Archive. Nucleic Acids Research, v. 39, n. D1, p. D19-D21, 2011. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019.

LEVY, S. E.; MYERS, R. M. Advancements in next-generation sequencing. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 17, p. 95-115, 2016. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413.

LEY, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. Science, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1155725.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Research, v. 42, n. D1, p. D490-D495, 2014. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. FEMS Microbiology Letters, v. 294, n. 1, p. 1-8, 2009. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x.

MAKAROVA, K. S. et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology, v. 18, n. 2, p. 67-83, 2020. DOI: https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome, v. 3, p. 31, 2015. DOI: https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes and Infection, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000. DOI: https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2.

MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. Nature, v. 526, n. 7571, p. 55-61, 2015. DOI: https://doi.org/10.1038/nature15386.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clinical Microbiology Reviews, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11.

MERENSTEIN, D. et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. Gut Microbes, v. 15, n. 1, 2185034, 2023. DOI: https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server: a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics, v. 9, p. 386, 2008. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020. Proíbe a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores do desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Proíbe, em todo o território nacional, a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 nov. 2016.

MIQUEL, S. et al. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. Current Opinion in Microbiology, v. 16, n. 3, p. 255-261, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.003.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. World's Poultry Science Journal, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017. DOI: https://doi.org/10.1017/S0043933917000071.

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Nature Reviews Microbiology, v. 17, n. 6, p. 371-382, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5.

NAEMI, A. O. et al. NarAB is an ABC-type transporter that confers resistance to the polyether ionophores narasin, salinomycin, and maduramicin, but not monensin. Frontiers in Microbiology, v. 11, 104, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00104.

OAKLEY, B. B. et al. The chicken gastrointestinal microbiome. FEMS Microbiology Letters, v. 360, n. 2, p. 100-112, 2014. DOI: https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 71, n. 10, 005056, 2021. DOI: https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). OECD-FAO agricultural outlook 2022-2031. Paris: OECD Publishing, 2022. DOI: https://doi.org/10.1787/f1b0b29c-en.

OULAS, A. et al. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. Bioinformatics and Biology Insights, v. 9, p. 75-88, 2015. DOI: https://doi.org/10.4137/BBI.S12462.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Research, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015. DOI: https://doi.org/10.1101/gr.186072.114.

PARKS, D. H. et al. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalised and complete genome-based taxonomy. Nucleic Acids Research, v. 50, n. D1, p. D785-D794, 2022. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkab776.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews, v. 31, n. 4, p. e00088-17, 2018. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17.

PEDROSO, A. A.; BATAL, A. B.; LEE, M. D. Effect of in ovo administration of an adult-derived microbiota on establishment of the intestinal microbiome in chickens. American Journal of Veterinary Research, v. 77, n. 5, p. 514-526, 2016. DOI: https://doi.org/10.2460/ajvr.77.5.514.

QUINCE, C. et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nature Biotechnology, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/nbt.3935.

RANTALA, M.; NURMI, E. Prevention of the growth of Salmonella infantis in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. British Poultry Science, v. 14, n. 6, p. 627-630, 1973. DOI: https://doi.org/10.1080/00071667308415836.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters, v. 245, n. 2, p. 195-203, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034.

ROWLAND, I. et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. European Journal of Nutrition, v. 57, n. 1, p. 1-24, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8.

RUSSEL, J.; PINILLA-REDONDO, R.; MAYO-MUÑOZ, D.; SHAH, S. A.; SØRENSEN, S. J. CRISPRCasTyper: automated identification, annotation, and classification of CRISPR-Cas loci. The CRISPR Journal, v. 3, n. 6, p. 462-469, 2020. DOI: https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0059.

RYCHLIK, I. Composition and function of chicken gut microbiota. Animals, v. 10, n. 1, p. 103, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/ani10010103.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975. DOI: https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2.

SASSONE-CORSI, M. et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. Nature, v. 540, n. 7632, p. 280-283, 2016. DOI: https://doi.org/10.1038/nature20557.

SCHWARZ, S. et al. Mobile oxazolidinone resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Clinical Microbiology Reviews, v. 34, n. 3, e00188-20, 2021. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00188-20.

SEGURA-WANG, M. et al. Genome-resolved metagenomics of the chicken gut microbiome. Frontiers in Microbiology, v. 12, 726923, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726923.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS Biology, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533.

SHANG, Y.; KUMAR, S.; OAKLEY, B.; KIM, W. K. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. Frontiers in Veterinary Science, v. 5, p. 254, 2018. DOI: https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00254.

SHIN, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends in Biotechnology, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011.

SHMAKOV, S. A. et al. The CRISPR spacer space is dominated by sequences from species-specific mobile genetic elements. mBio, v. 8, n. 5, p. e01397-17, 2017. DOI: https://doi.org/10.1128/mBio.01397-17.

SILES, J. A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M. Studying microbial communities through co-occurrence network analyses during processes of waste treatment and in organically amended soils: a review. Microorganisms, v. 9, n. 6, p. 1165, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms9061165.

SMILLIE, C. S. et al. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. Nature, v. 480, n. 7376, p. 241-244, 2011. DOI: https://doi.org/10.1038/nature10571.

SØRUM, M. et al. Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcin. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 1, p. 516-521, 2006. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.516-521.2006.

STANLEY, D. et al. Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria. Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 959, 2015. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00959.

STANLEY, D. et al. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 98, n. 10, p. 4301-4310, 2014. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-014-5646-2.

TANG, K. L. et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Planetary Health, v. 1, n. 8, p. e316-e327, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry #213: new animal drugs and new animal drug combination products administered in or on medicated feed or drinking water of food-producing animals. Silver Spring, MD: FDA, 2017. Disponível em: https://www.fda.gov/media/83488/download. Acesso em: 20 jan 2025.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112.

VAN HEEL, A. J. et al. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. Nucleic Acids Research, v. 46, n. W1, p. W278-W281, 2018. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gky383.

VARMUZOVA, K.; KUBASOVA, T.; DAVIDOVA-GERZOVA, L.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; SEBKOVA, A.; FALDYNOVA, M.; RYCHLIK, I. Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to Salmonella Enteritidis infection. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 957, 2016. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00957.

VIDENSKA, P. et al. Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. BMC Veterinary Research, v. 9, p. 30, 2013. DOI: https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-30.

VIECO-SAIZ, N. et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Frontiers in Microbiology, v. 10, 57, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057.

WANG, Y. et al. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in Escherichia coli of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. The Lancet Infectious Diseases, v. 20, n. 10, p. 1161-1171, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30149-3.

WANG, Y. et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nature Biotechnology, v. 39, n. 11, p. 1348-1365, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x.

WATSON, B. N. J.; STAALS, R. H. J.; FINERAN, P. C. CRISPR-Cas-mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction. mBio, v. 9, n. 1, e02406-17, 2018. DOI: https://doi.org/10.1128/mBio.02406-17.

WHIPPS, J. M.; LEWIS, K.; COOKE, R. C. Mycoparasitism and plant disease control. In: BURGE, M. N. (ed.). Fungi in biological control systems. Manchester: Manchester University Press, 1988. p. 161-187.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. Journal of Animal Science, v. 86, n. 14, suppl., p. E140-E148, 2008. DOI: https://doi.org/10.2527/jas.2007-0459.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine. 5th rev. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/critically-important-antimicrobials-for-human-medicine. Acesso em: 25 jan 2025.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nature Reviews Microbiology, v. 5, n. 3, p. 175-186, 2007. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro1614.

YEOMAN, C. J. et al. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. Animal Health Research Reviews, v. 13, n. 1, p. 89-99, 2012. DOI: https://doi.org/10.1017/S1466252312000138.

YILMAZ, P. et al. Minimum information about a marker gene sequence (MIMARKS) and minimum information about any (x) sequence (MIxS) specifications. Nature Biotechnology, v. 29, n. 5, p. 415-420, 2011. DOI: https://doi.org/10.1038/nbt.1823.

ZHANG, Y. et al. Improved microbial genomes and gene catalog of the chicken gut from metagenomic sequencing of high-fidelity long reads. GigaScience, v. 11, p. giac116, 2022. DOI: https://doi.org/10.1093/gigascience/giac116.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. FEMS Microbiology Reviews, v. 32, n. 5, p. 723-735, 2008. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.