

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE DIETETICA CON CITROBEX® SUL MICROBIOMA INTESTINALE DEL BROILER

De Cesare A.¹, Indio V.¹, Lucchi A.², Pasquali F.², Parra Titos E.³, Bertuzzi S.³, Manfreda G.²

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;*

² *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro Alimentari (DISTAL) – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Viale Giuseppe Fanin, 44 – 40127 Bologna (BO), Italia;*

³ *Vetoquinol Italia srl, Via Piana 265, 47032 Bertinoro (FC), Italia.*

Summary

The objective of the present research activity was to compare the efficacy of the supplementation of an emulsifier in broiler chicken diets on microbiome of intestinal tract of broiler. A total of 1,000 1-day-old male chicks Ross 308, obtained from the same hatching session, housed at a stocking density of 10 chicks/m² for a total of 25 birds per pen, has been divided in four experimental groups (250 bird/group): CON=Control; CBX1= Citrobex® 100 g/quintal water during starter phase from 0 to 14 days of age; CBX2= Citrobex® 100 g/quintal water during grower phase from 15 to 28 days of age and CBX3= Citrobex® 100 g/quintal water during finisher phase from 28 to 42 days of age. A total of 70 caecal content were collected at 21 and 42 days of age and shotgun metagenomic sequencing was performed using the NextSeq500 (Illumina) 2x150 bp in paired-end mode. The scaffold produced by each sequencing sample was uploaded on MG-RAST web tool that was adopted to detect functional genes based on KEGG Orthology (KO) level 3. The bioinformatic tool Metaphlan3 was implemented to profile the composition of the microbial communities that was evaluated at the different taxonomic level including phylum, class, order, family, genus and species. For both taxonomic levels and functional genes, the relative frequency of abundance was computed and the two-sided Welch's t-test was applied in order to highlight statistically significant differences in terms of taxa abundance and gene function. The results of microbiota analysis showed an increase of microbial diversity in the treated groups and in particular in the CBX3 group confirming a positive impact of the treatment in order to prevent gastrointestinal dysbiosis. In particular Lachnospirillum genera increased in the caeca of broiler of CBX3 group and that play an important role in the production of butyrate which is the preferred energy source for the gut epithelial cells. Moreover, the significant increase of Lactobacillus gallinarum in the treated group (CBX1, CBX2 and CBX3) and Lactobacillus crispatus in CBX2 in comparison with CON group can impact on health of animal. From metabolic point of view the statistically increase of cobalt/nickel transport system and antibiotic transport system ATP-binding protein in CBX2 and CBX3 groups in comparison with CON group represented an important transmembrane transport of a diverse array of substrates including drugs, sugars, ions, amino acids and proteins and that could be associated to the increase of lachnospirillum more abundant in the treated groups. Finally, the significant increase of DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 in the CBX2 and

CBX3 groups in comparison with CON group play a relevant role to prevent in the modification of DNA by methylation that commonly occurs in prokaryotes, as 'immune responses' to phage infection.

INTRODUZIONE

La carne di pollame è un alimento molto popolare, molto versatile che viene consumato in grandi quantità rispetto ad altre carni. La sua produzione, tuttavia, richiede una ottimale gestione dell'allevamento per ridurre le patologie e minimizzare i costi. In passato l'impiego di antibiotici, come promotori della crescita, rappresentava lo strumento più efficace per raggiungere gli obiettivi di una elevata redditività delle produzioni avicole. A partire dal 2006 l'impiego degli antibiotici quali promotori di crescita è stato vietato anche in considerazione della crescente incidenza della resistenza agli antibiotici, considerata una delle maggiori minacce per la salute pubblica a livello globale. Ciò ha portato a ricercare possibili sostituti, i quali modulando il microbiota intestinale in modo benefico e "naturale" permettano di migliorare la salute degli animali garantendo ottimali livelli produttivi.

Tra i diversi composti indagati un elevato interesse ha riguardato l'impiego di probiotici (De Cesare et al., 2017; Qiu et al., 2022) come pure l'utilizzo di composti bioattivi naturali di origine vegetale, in particolare gli acidi fenolici, i flavonoidi e i terpenoidi (EO), per le loro proprietà multifunzionali e il potenziale nutraceutico (Segneanu et al., 2017; Djenane, 2015). Tali composti naturali possiedono proprietà antitumorali e forniscono vari effetti benefici per la salute tra cui attività antinfiammatorie, antiossidanti e antimicrobiche (Degirmenci & Erkurt 2020). Sono anche usati per proteggere gli alimenti da agenti patogeni e batteri che alterano il cibo (Burt, 2004), dall'irrancidimento, dallo scolorimento o dal deterioramento dovuto all'autoossidazione (Hashemi et al. 2016).

In commercio sono attualmente disponibili estratti vegetali da *Citrus aurantium*, noto come arancia amara, un albero che appartiene all'ordine dei Geraniales e alla famiglia delle Rutaceae. I principali costituenti biologici attivi presenti nel *Citrus aurantium* sono i flavonoidi, in particolare l'esperidina, la naringina e gli alcaloidi, principalmente sinefrina, con effetti medici benefici sulla salute umana (Pellati et al., 2002). L'estratto di *Citrus aurantium* è stato usato nella medicina tradizionale cinese per trattare la nausea, la stitichezza, il cancro, gli effetti cardiovascolari e come sedativi (Suntar et al., 2018).

Nel settore animale l'estratto etanolic di fogli di *Citrus aurantium* è stato efficacemente impiegato nel controllo della coccidiosi (Ishaq et al., 2022). L'azione benefica si è ipotizzato possa essere legata ad una modulazione della microflora intestinale che porterebbe ad una riduzione dell'eliminazione di oocisti. Tuttavia ad oggi studi sulla modulazione della microflora intestinale nel broiler a seguito dell'impiego di estratti di *Citrus aurantium* non sono disponibili nonostante il significativo progresso delle tecniche analitiche basate sul sequenziamento che consentono di ottenere un profilo completo includente anche specie microbiche non coltivabili con i tradizionali sistemi analitici.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di comparare l'effetto dell'integrazione nell'acqua da bere di un estratto vegetale, ottenuto da *Citrus aurantium* e somministrato in differenti fasi dell'allevamento, sul microbiota e sulle funzioni metaboliche del cieco del broiler utilizzando la tecnica dell'analisi metagenomica.

MATERIALI E METODI

Un totale di 1.000 pulcini maschi di 1 giorno Ross 308, ottenuti dalla stessa sessione di schiusa, e suddivisi omogeneamente in base al peso sono stati accasati ad una densità di 10 pulcini/m² per un totale di 25 capi per box, e suddivisi in quattro gruppi sperimentali (250 capi /gruppo): CON=Controllo; CBX1= Citrobex® 100 g/ql di acqua in fase di avviamento da 0 a 14 giorni di età; CBX2= Citrobex® 100 g/ql d'acqua durante la fase di accrescimento dai 15 ai 28 giorni di età e CBX3= Citrobex® 100 g/ql d'acqua durante la fase di ingrasso dai 28 ai 42 giorni di età. Tutti i pulcini al momento della schiusa sono stati vaccinati contro il virus della bronchite infettiva, della malattia di Marek, della malattia di Newcastle e della malattia di Gumboro.

Campionamento

In totale 70 broiler appartenenti ai quattro differenti gruppi sperimentali CON (n=20), CBX1(n=20) CBX2 (n=20) e CBX3 (n=10) sono stati sacrificati a 21 (30 animali) e 42 giorni (40 animali) di vita. Dopo abbattimento è stato prelevato aseptivamente il contenuto del cieco di ciascun animale ed immediatamente sottoposto a congelamento a -80°C fino al momento dell'analisi.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto da ciascun campione utilizzando una procedura a base di biglie come previsto dal kit QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia). Il DNA estratto da ciascun campione è stato quantificato utilizzando un BioSpectrometer® (Eppendorf, Milano, Italia) per valutare la resa del DNA, in termini di quantità e qualità.

Preparazione delle library e sequenziamento metagenomico

Il DNA totale di ciascun campione è stato frammentato e contrassegnato con indici di sequenziamento e adattatori utilizzando il Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA). Il sequenziamento metagenomico è stato eseguito utilizzando NextSeq500 (Illumina) 2x150 bp in modalità paired-end.

Analisi bioinformatiche delle sequenze

Il filtraggio e il taglio delle reads ottenute dal sequenziamento sono stati eseguiti utilizzando il tool Adapter Removal. Le sequenze ottenute dopo filtraggio e taglio sono state elaborate con la pipeline SOAPdenovo2 al fine di eseguire il de novo assembly adottando i parametri “-K 55 -p 26 -M 3 -F -u”. Lo scaffold prodotto da ciascun campione di sequenziamento è stato caricato sulla piattaforma MG-RAST al fine di rilevare i geni funzionali utilizzando il KEGG Orthology database. Il tool bioinformatico Metaphlan3 è stato implementato per ottenere il profilo microbico dei singoli campioni comprendente phylum, classe, ordine, famiglia, genere e specie.

Analisi statistica dei dati

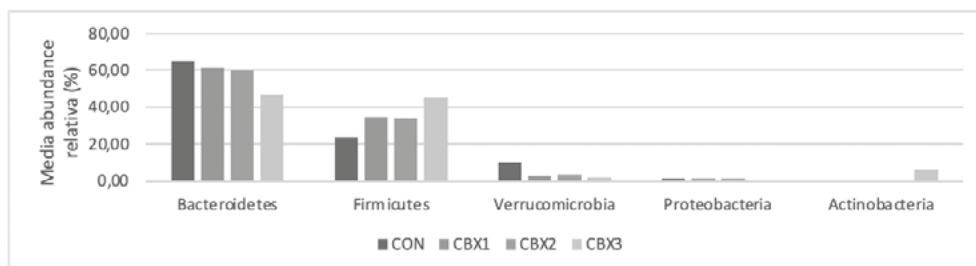
Al fine di valutare la diversità del microbiota nei diversi gruppi sperimentali è stato calcolato il valore alfa adottando i modelli Shannon, Simpson e Fisher mediante il tool Vegan. Sia per i livelli tassonomici che per i geni funzionali è stata calcolata la frequenza relativa dell'abbondanza ed è stato applicato il test t di Welch a due code per evidenziare differenze statisticamente significative in termini di abbondanza di taxa e geni funzionali.

RISULTATI

Risultati relativi al microbiota

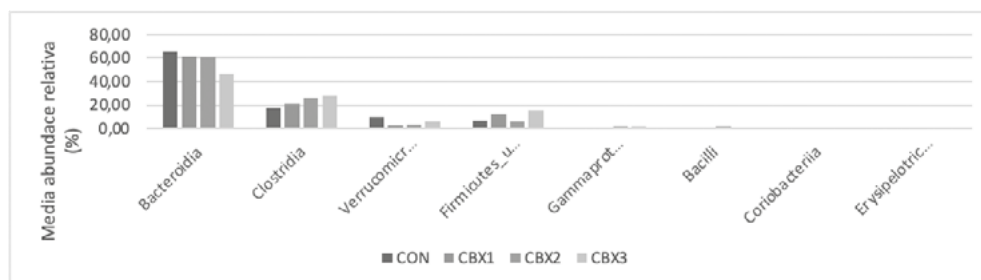
In termini generali i risultati relativi al microbiota cecale dei polli da carne sottoposti a sperimentazione hanno mostrato scarse o nulle differenze statistiche a 21 giorni di età mentre rilevante differenze si sono osservate a 42 giorni di età. In particolare i risultati relativi ai diversi phylum batterici a 42 giorni di età hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'abundance relativa di Firmicutes in tutti i gruppi trattati con Citrobex® rispetto al gruppo di controllo assieme ad una riduzione significativa dei Bacteroidetes nel gruppo CBX3 (Figura 1).

Figura 1 – Confronto delle medie di abundance relativa dei phylum batterici rilevati a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



In termini di classi batteriche l'aumento dei Firmicutes a 42 giorni di età nei gruppi trattati era associato ad un aumento significativo di Clostridia nei gruppi CBX2 (26,04%) e CBX3 (28,16%) rispetto al Controllo (17,01%) e di Firmicutes unclassified nel gruppo CBX3 (15,74%) rispetto al gruppo di Controllo (6,40%). Contestualmente la riduzione significativa dei Bacteroidetes era associata ad una significativa riduzione della classe dei Bacteroidia nel gruppo CBX3 (46,58%) rispetto a tutti gli altri gruppi (Figura 2).

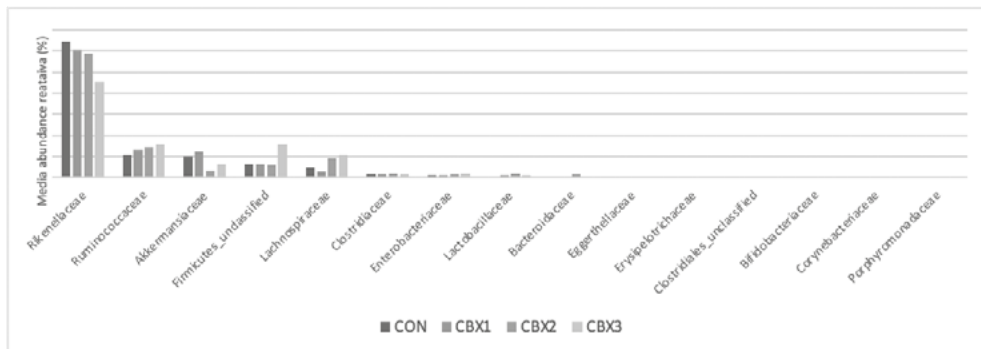
Figura 2 – Confronto delle medie di abundance relativa delle classi batteriche rilevate a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



L'analisi statistica dell'abundance relativa delle diverse famiglie batteriche ha mostrato i seguenti risultati statisticamente significativi: 1) Lachnospiraceae più elevata nei gruppi CBX2 (9,21%) e CBX3 (10,67%) rispetto al Controllo (4,57%); 2) Lactobacillales più elevata nel gruppo CBX2 (2,14%) rispetto agli altri gruppi

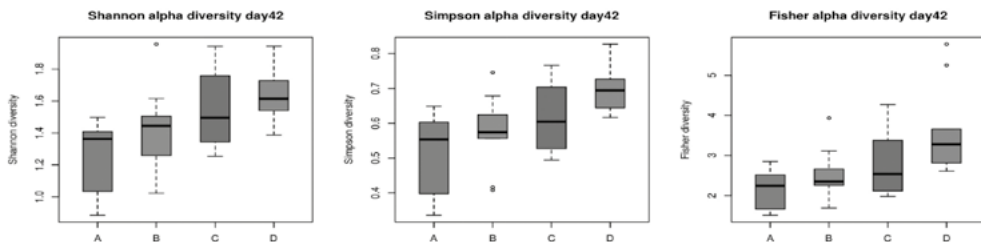
sperimentali; 3) Firmicutes unclassified più elevata nel gruppo CBX3 (15,74%) rispetto al Controllo (6,40%); 4) Bacteroidaceae più elevate nel gruppo CBX3 (0,66%) rispetto al Controllo (0,18%); 5) Rikenellaceae più bassa nel gruppo CBX3 (45,19%) rispetto ad altri gruppi sperimentali (Figura 3).

Figura 3 – Confronto delle medie di abundance relativa delle famiglie batteriche rilevate a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età



In termini di diversità dei generi batterici rilevati il test dell'alpha diversity condotto con 3 differenti modelli statistici ha confermato un aumento di diversità nei gruppi trattati ed in particolare nel gruppo CBX3 rispetto al Controllo (Figura 4).

Figure 4 – Alpha diversity dei generi batterici rilevati a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



A= Gruppo CON; B=Gruppo CBX1; C=Gruppo CBX2; D=Gruppo CBX3

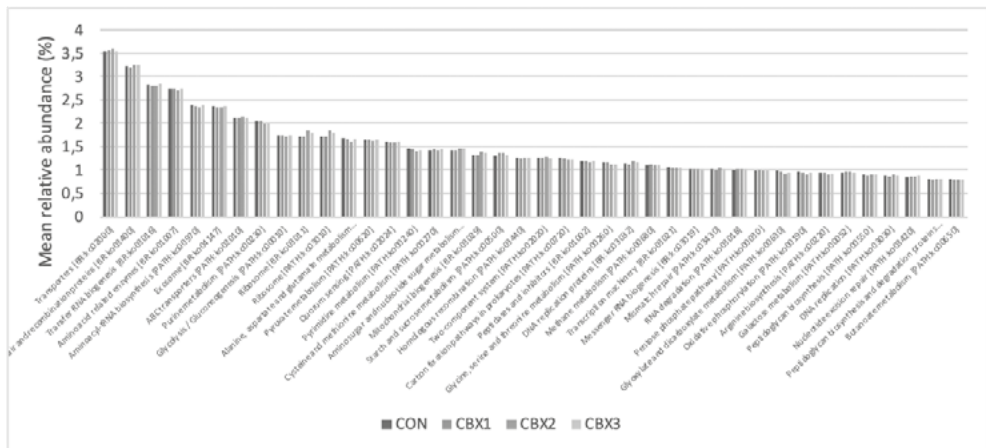
In termini di specie batteriche nel cieco dei polli a 42 giorni di età i risultati complessivi hanno mostrato le seguenti differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali: 1) *Lachnospiraceae* sp An118, *Lachnospiraceae* sp An131, *Lachnospiraceae* sp An138 e *Lactobacillus gallinarum* sono risultati più elevati nei gruppi trattati (CBX1, CBX2 e CBX3) rispetto al gruppo di Controllo; 2) *Anaeromassilibacillus* sp An172 è risultato più elevato in CBX2 (1,24%) e CBX3 (0,45%) rispetto al gruppo di Controllo (0,07%); 3) *Lactobacillus crispatus* è risultato più elevato nel gruppo CBX2 (0,68%) rispetto al gruppo CON (0,19%);

4) Pseudoflavonifractor sp An184, Bacteroides fragilis e Firmicutes CAG 94 sono risultati più elevati nel gruppo CBX3 (7,46%; 0,66%; 15,74) rispetto al gruppo di Controllo (3,60%; 0,18%; 6,40); 5) Alistipes sp_CHKCI003 e Gordonibacter pamelaee sono risultati inferiori nel gruppo CBX3 (45,19%; 0,06%) rispetto ad altri gruppi sperimentali.

Risultati relativi ai geni funzionali

I risultati complessivi delle prime 40 vie metaboliche (livello 3) identificate sul contenuto cecali dei polli da carne a 42 giorni di età nei diversi gruppi sperimentali hanno mostrato le seguenti differenze statisticamente significative: 1) riduzione del metabolismo delle purine, della pirimidina, glicina, della serina e della treonina, del gliossilato e del dicarbossilato, nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto ai gruppi di Controllo e CBX1; 2) riduzione del metabolismo di alanina, aspartato e glutammato, della fosforilazione ossidativa e della biosintesi dell'arginina nel gruppo CBX2 rispetto ai gruppi di Controllo e CBX1; 3) riduzione del metabolismo del butanoato nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di controllo; 4) aumento del metabolismo degli amminozuccheri, dei nucleotide sugar e della biogenesi mitocondriale, nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo; 5) Un aumento del ribosoma, DNA replication proteins and Mismatch repair nel gruppo CBX2 rispetto al gruppo di Controllo; 6) Aumento della biogenesi mitocondriale, del metabolismo della glicina, della serina e della treonina, del DNA repair and recombination proteins nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo CBX1; 7) aumento del metabolismo di alanina, aspartato e glutammato e della biosintesi dell'arginina nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo CBX2 (Figura 5).

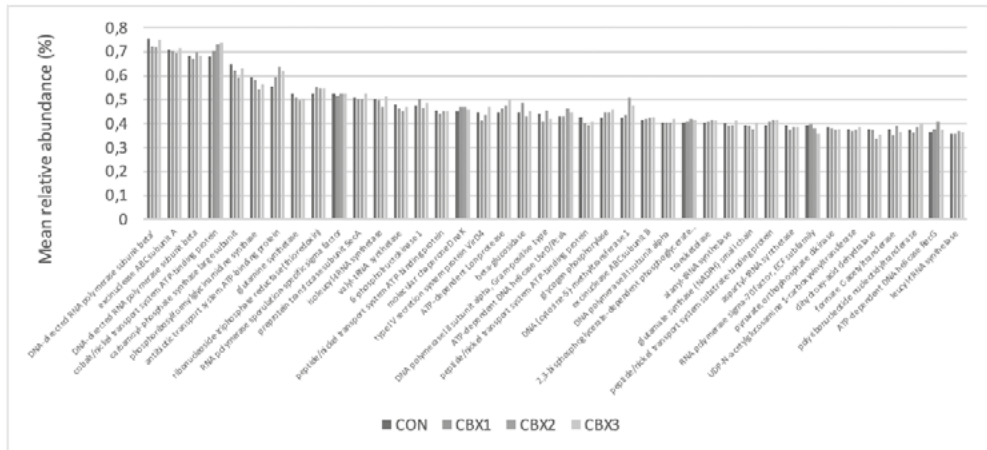
Figura 5 – Confronto della media dell'abundance relativa dei pathway metabolici (livello 3) rilevati a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



I risultati complessivi relativi alle prime 40 funzioni metaboliche identificate sul contenuto cecali dei polli da carne a 42 giorni di età nei diversi gruppi sperimentali hanno mostrato le seguenti differenze statisticamente significative: 1) riduzione del formate C-acetyltransferase, aspartyl-tRNA synthetase and DNA polymerase III

subunit alpha, Gram-positive type nel gruppo CBX1 rispetto al gruppo di Controllo; 2) aumento del cobalt/nickel transport system ATP-binding protein, antibiotic transport system ATP-binding protein, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 and ATP-dependent DNA helicase RecG nel gruppo CBX2 rispetto al gruppo di Controllo; 3) riduzione del phosphoribosyl formyl glycinamide synthase, glutamine synthetase, isoleucyl-tRNA synthetase, valyl-tRNA synthetase and dihydroxy-acid dehydratase nel gruppo CBX2 rispetto al gruppo di Controllo; 4) un aumento cobalt/nickel transport system ATP-binding protein, antibiotic transport system ATP-binding protein, ATP-dependent Lon protease and DNA (cytosine-5)-methyltransferase nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di Controllo; 5) un aumento type IV secretion system protein VirD4 and polyribonucleotide nucleotidyltransferase nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo CBX1 6) un aumento del carbamoyl-phosphate synthase large subunit, isoleucyl-tRNA synthetase and glutamate synthase (NADPH) small chain nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo CBX2 (Figura 6).

Figura 5 – Confronto della media dell’abundance relativa delle funzioni metaboliche (livello 3) rilevate a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



DISCUSSIONE

In relazione ai risultati del microbiota, l’aumento della diversità microbica nei gruppi trattati con Citrobex® ed in particolare nel gruppo CBX3 conferma l’impatto positivo del trattamento al fine di prevenire la disbiosi gastrointestinale.

L’aumento del batterio Firmicutes CAG94, Lachnospiraceae (famiglia) e Lachnocostridium (generi) nei gruppi trattati ed in particolare nel cieco dei polli da carne del gruppo CBX3 gioca un ruolo importante nella produzione di butirrato che è la fonte di energia preferita per le cellule dell’epitelio intestinale. Questi batteri, infatti, sono importanti degradatori di polisaccaridi complessi e produttori di acidi grassi a catena corta (SCFA) (Gallausiaux et al., 2018).

L’aumento di Bacteroides nel gruppo CBX3 può essere considerato un altro effetto positivo del trattamento. Infatti, questi batteri sono noti per produrre propionato come prodotto principale della degradazione dei polisaccaridi vegetali complessi (Rios-Covian

et al., 2017). Sebbene il propionato sia una fonte di energia meno preferita del butirrato, la sua produzione potrebbe rappresentare un equilibrio efficiente tra l'acquisizione di energia dai nutrienti disponibili e la crescita sostenuta dei polli da carne.

Anche l'aumento significativo di *Anaeromassilibacillus* sp. An200 e *Pseudoflavonifractor* sp. An184 nel gruppo CBX3, può essere associati ad un aumento della produzione di propionato e butirrato come riportato da Jing e collaboratori (2022).

Importante è l'aumento significativo di *Lactobacillus gallinarum* nei gruppi trattati (CBX1, CBX2 e CBX3) e *Lactobacillus crispatus* nel gruppo CBX2 rispetto al gruppo di Controllo. Uno studio recente ha dimostrato che *L. gallinarum* ha aumentato l'abundance di batteri probiotici intestinali e ridotto i potenziali patogeni intestinali (Sugimura et al., 2021). Inoltre diversi ceppi di *Lactobacillus*, tra cui *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* e *L. salivarius*, si sono dimostrati un'efficace alternativa agli antibiotici per il mantenimento della salute intestinale e della capacità immunitaria dei polli da carne.

Infine anche la significativa riduzione di *Alistipes* sp. CHKCI003 nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di Controllo è da considerarsi un effetto positivo del trattamento con Citrobex®. Infatti questo microrganismo è stato associato a patologie intestinali, cardiovascolari e riduzione della risposta immunitaria (Parker et al., 2020). Recenti studi di Jing e collaboratori (2022) hanno inoltre associato questa specie microbica al deposito di grasso nel broiler fattore che compromette la redditività delle produzioni avicole.

Relativamente alle funzioni metaboliche rilevate, la DNA (citosine-5)-metiltransferasi 1 gioca un ruolo rilevante nella metilazione del DNA fenomeno assai comune in organismi diversi come batteri, piante e mammiferi. Nei procarioti, la metilazione dei residui di citosina e adenina rappresenta una efficace "risposta immunitaria" all'infezione fagica. Inoltre la metilazione dell'adenina nei procarioti è anche coinvolta nella regolazione dell'inizio della replicazione del DNA e nel correggere errori nella replicazione del DNA (Kumar et al., 1994). Di conseguenza un significativo aumento di questa funzione metabolica nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo costituisce un aumento della risposta immunitaria e delle capacità di correzione degli errori di replicazione del DNA cellulare.

I trasportatori ABC (ATP-binding cassette) sono presenti in tutti e tre i domini della vita e mediano il trasporto transmembrana di una vasta gamma di substrati inclusi farmaci, zuccheri, ioni, amminoacidi e proteine. Il significativo aumento del cobalt/nickel transport system ATP-binding protein nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo è rilevante per la replicazione batterica dal momento che gli ioni nichel e cobalto sono richiesti dai procarioti per essere incorporati in diversi enzimi coinvolti nelle reazioni metaboliche centrali (Rodionov et al., 2006). Contestualmente l'aumento dell'antibiotic transport system ATP-binding protein nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo può essere associato all'attività inibente batterica presentata dal Citrobex® in prove in vitro (dati non riportati) probabilmente dipendente dall'azione dei flavonoidi presenti nel prodotto. Infine il significativo aumento della proteasi Lon ATP-dipendente nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di Controllo conferma l'effetto positivo del trattamento con Citrobex®. Questa proteasi è altamente conservata negli archaea, negli eubatteri, nei mitocondri e nei perossisomi eucariotici. Studi di Lee & Suzuki (2008) hanno dimostrato che Lon degrada selettivamente le proteine anormali e regolatorie e quindi svolge un ruolo significativo nel mantenimento della funzione e dell'integrità batterica e mitocondriale e più in generale dell'omeostasi cellulare.

CONCLUSIONI

La recente ricerca di modulatori del microbiota intestinale al fine di migliorare la salute degli animali garantendo ottimali livelli produttivi è rivolta all'impiego di composti bioattivi naturali di origine vegetale, in particolare acidi fenolici, flavonoidi e terpenoidi (EO). In questo studio si è analizzato l'effetto di un estratto vegetale da *Citrus aurantium*, commercializzato con il nome Citrobex® contenente diversi flavonoidi ed alcaloidi, quali esperidina, naringina e sinefrina, i quali hanno già dimostrato effetti benefici sulla salute umana (Pellati et al., 2002). In questa ricerca il Citrobex® somministrato nell'acqua da bere per due settimane continuativamente alla dose di 100g/ql in differenti momenti del ciclo di vita del broiler ha dimostrato complessivamente un impatto positivo sul microbiota cecale con un significativo incremento della diversità microbica ed in particolare di generi e specie batteriche, appartenenti prevalentemente al phylum dei Firmicutes. tutte produttrici di butirrati o propionati considerati metaboliti fondamentali per una condizione ottimale dello sviluppo e integrità della mucosa intestinale ossia di quello che viene definito come "gut health". In particolare il trattamento effettuato a fine ciclo ossia dal 28° giorno di vita fino alla macellazione è quello che ha prodotto i risultati migliori rispetto al gruppo di controllo. Tale effetto positivo è stato confermato anche dall'incremento dei geni funzionali associati ad una migliore risposta immunitaria (DNA citosine-5-metiltransferasi 1), i trasportatori ABC (ATP-binding cassette) e la proteasi Lon ATP-dipendente associati al mantenimento della funzione e dell'integrità batterica e mitocondriale, della replicazione batterica e più in generale dell'omeostasi cellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. Burt S. Essential oils—their antibacterial properties and potential applications in food. *Int J Food Microbiol* 2004; 94:223–53.
2. De Cesare A., Sirri F., Manfreda G., Moniaci P., Giardini A., Zampiga M., & Meluzzi A. (2017). Effect of dietary supplementation with *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) on caecum microbioma and productive performance in broiler chickens. *PLoS One*. 12:e0176309 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176309>.
3. Degirmenci H. & Erkurt H. (2020). Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers. *Journal of Infection and Public Health* 13 (2020) 58–67.
4. Djenane D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods* 2015;4:208–28, <http://dx.doi.org/10.3390/foods4020208>.
5. Ishaq A.N., Sani D., Abdullahi S.A., Jolayemi K.O., Ebbo A.A., Jatau I.D., & Gadzama I. M.K. (2022). Evaluation of Anticoccidial Activity of *Citrus aurantium* L. Ethanolic Leaf Extract against Experimental *Eimeria tenella* Infection in Broiler Chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* 4 (2022) 100138, <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100138>.
6. Hashemi S.M.B., Amininezhad R., Shirzadinezhad E., Farahani M., & Yousefabad S.H.A. (2016). The antimicrobial and antioxidant effects of *Citrus aurantium* L. flowers (BaharNarang) extract in traditional yoghurt stew during refrigerated storage. *J FoodSafe* 2016;36(2):153–61, <http://dx.doi.org/10.1111/jfs.12222>.
7. Jing Y., Yuan Y., Monson M., Wang P., Mu F., Zhang Q., Na W., Zhang K., Wang

- Y., Leng L., Li Y., Luan P., Wang N., Guo R., Lamont S.J., Li H. & Yuan H. (2022). Multi-Omics Association Reveals the Effects of Intestinal Microbiome–Host Interactions on Fat Deposition in Broilers. *Front. Microbiol.* 12:815538. doi: 10.3389/fmicb.2021.815538.
8. Kumar S., Cheng X., Klimasauskas S., Mi S., Posfai J., Roberts R.J. & Wilson G.G. (1994). The DNA (cytosine-5). methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol. 22, No. 1 1-10.
 9. Lee I. & Suzuki C.K. (2008). Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May; 1784(5): 727–735.
 10. Martin-Gallausiaux C., Larraufie P., Jarry A., Béguet-Crespel F., Marinelli L., Ledue F., Reimann F., Blottière H.M. & Lapaque N. (2018). Butyrate Produced by Commensal Bacteria Down-Regulates Indolamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) Expression via a Dual Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 9:2838. doi: 10.3389/fimmu.2018.02838.
 11. Parker B.J., Wearsch P.A., Veloo A.C.M., & Rodriguez-Palacios A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front. Immunol.* 11:906. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906.
 12. Pellati F., Benvenuti S., Melegari M., & Firenzuoli Fm (2002). Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *Amara*, *J Pharm Biomed Anal* 29 (6) (2002) 1113–1119 2002 .
 13. Qiu K., Wang X., Zhang H., Wang J., Qi G., & Wu S. (2022). Dietary Supplementation of a New Probiotic Compound Improves the Growth Performance and Health of Broilers by Altering the Composition of Cecal Microflora. *Biology* 2022, 11, 633. <https://doi.org/10.3390/biology11050633>.
 14. Rios-Covian D., Salazar N., Gueimonde M. & de los Reyes-Gavilan C.G. (2017) Shaping the Metabolism of Intestinal *Bacteroides* Population through Diet to Improve Human Health. *Front. Microbiol.* 8:376. doi: 10.3389/fmicb.2017.00376.
 15. Rodionov D.A., Hebbeln P., Gelfand M.S., & Eitinger T (2006). Comparative and Functional Genomic Analysis of Prokaryotic Nickel and Cobalt Uptake Transporters: Evidence for a Novel Group of ATP-Binding Cassette Transporters. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Jan. 2006, p. 317–327.
 16. Segneanu A.E., Velcirov S.M., Olariu S., Cziple F., Damian D., Grozescu I. Bioactivemolecules profile from natural compounds. In: Asao T, Asaduzzaman M, editors. *Amino acid—new insights and roles in plant and animal*. IntechOpen; 2017. p.209–28, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68643>.
 17. Sugimura N., Li Q., Chu E.S.H., Lau H.C.H., Fong W., Liu W., Liang C., Nakatsu G., Su A.C.Y., Coker O.O., Wu V.K.K., Chan F.K.L., & Yu J. (2021). *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis. *Gut* 2021;0:1–11. doi:10.1136/gut-jnl-2020-323951.
 18. Suntar I., Khan H., Patel S., Celano R., & Rastrelli K., (2018). An Overview on *Citrus aurantium* L: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent, *Oxidat Med Cell Long* (2018) 101155/2018/7864269.