



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

**Comunidades bacterianas implicadas en sistemas de producción aviar.  
Factores de modulación e intervenciones sustentables.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

**Ing. Agr. Natalia Daniela Pin Viso**

Directora de tesis: Dra. Marisa D. Farber  
Co-Director de tesis: Dr. Mariano Fernández Miyakawa  
Consejero de Estudios: Dr. Leonardo Erijman  
Lugar de trabajo: Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular,  
IABiMo, INTA-CONICET

Buenos Aires, 2021

Fecha de defensa: 14 de Octubre de 2021

## **Comunidades bacterianas implicadas en sistemas de producción aviar. Factores de modulación e intervenciones sustentables.**

### Resumen

Las comunidades bacterianas presentes en el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves son de vital importancia ya que contribuyen a su sanidad y nutrición. Además, cobran relevancia dado que las mismas pueden ser transferidas a suelos agrícolas cuando los residuos de la producción aviar son utilizados como enmiendas orgánicas. En la presente tesis se utilizaron técnicas de secuenciación masiva de amplicones del gen ARNr 16S con el objetivo de caracterizar estas comunidades bacterianas. Primeramente, se realizó un meta-análisis comparando la composición bacteriana del TGI de aves de diferentes países. Los resultados obtenidos mostraron el papel de la locación geográfica como modulador de la composición microbiana de ciegos permitiendo describir la “microbiota local” argentina. Además, se evaluaron los efectos de diferentes aditivos dietarios a escala experimental y comercial, encontrándose patrones diferenciales de modulación para cada aditivo, con un incremento en la relación Firmicutes/Bacteroidetes en los animales alimentados con taninos, debido a la mayor proporción de bacterias del orden Clostridiales. Finalmente, se describieron poblaciones de bacterias presentes en los residuos avícolas y el impacto que éstos producen en los agroecosistemas, particularmente en suelos agrícolas. Si bien la aplicación de guano y cama de pollo no mostró efectos significativos sobre la estructura de las comunidades bacterianas del suelo, se encontraron aumentos importantes en los valores de fósforo total y extractable, así como efectos fitotóxicos. Por este motivo, el guano fue tratado mediante compostaje y digestión anaeróbica encontrándose en cada enmienda obtenida, grupos taxonómicos y funcionales vinculados a cada tipo de tratamiento. Además, esto redujo el exceso de nutrientes y bacterias patógenas, permitiendo su utilización de forma segura, sin poner en riesgo la salud humana, animal ni vegetal, y disminuyendo el riesgo de contaminación de napas y cursos de agua.

Palabras claves: ecología microbiana, ciegos, residuos avícolas, promotores de crecimiento, gen ARNr 16S, modulación de la microbiota, suelos agrícolas, enmiendas.

## **Bacterial communities involved in avian production systems. Modulating factors and sustainable interventions.**

### Abstract

The bacterial communities present in the gastrointestinal tract (GIT) of birds are of vital importance as they contribute to their health and nutrition. In addition, they are relevant since can be transferred to agricultural soils when the waste of avian production are used as organic amendments. In the present study, metabarcoding of 16S rRNA gene was used in order to characterize these bacterial communities. First, a meta-analysis was carried out comparing the bacterial composition of the GIT of birds from different countries. The results obtained showed the role of the geographic location as a modulator factor of the microbial composition of cecum, allowing the Argentine “local microbiota” to be described. In addition, the effects of different dietary additives were evaluated on an experimental and commercial scale, finding differential modulation patterns for each additive, with an increase in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in animals fed with tannins, due to the higher proportion of bacteria of the order Clostridiales. Finally, bacteria communities present in poultry waste and the impact they produce on agroecosystems, particularly on agricultural soils, were described. Although the application of poultry manure and chicken litter did not show significant effects on the structure of the soil bacterial communities, significant increases were found in the values of total and extractable phosphorus, as well as phytotoxic effects. For this reason, the poultry manure was treated by composting and anaerobic digestion, finding in each amendment obtained, taxonomic and functional groups linked to each type of treatment. In addition, this reduced the excess of nutrients and pathogenic bacteria, allowing their use in a safe way, without putting human, animal, or plant health at risk, and reducing the risk of contamination of water courses.

Keywords: microbial ecology, cecum, poultry wastes, growth promoters, 16S rRNA gene, microbiota modulation, agricultural soils, amendments.

## **Agradecimientos**

Porque lejos está de ser para mí un logro individual, debo agradecer a todos aquellos que lo hicieron posible de forma directa o indirecta:

En primer lugar a mi directora, la Dra. Marisa Farber, por la posibilidad de realizar este trabajo en el IABiMo, brindándome su apoyo y paciencia, junto con las herramientas necesarias para el desarrollo de esta tesis, por compartir conmigo su experiencia, entusiasmo y por sus siempre necesarias palabras de aliento;

A mi codirector, el Dr. Mariano Fernández Miyakawa, por sus valiosas enseñanzas y por incentivar me a crecer al poner a prueba mis capacidades y conocimientos;

A la Dra. Norma Paniago, por su generosidad y su confianza, por brindarme la posibilidad de crecer, aprender y vivir experiencias inolvidables;

A Máximo Rivarola y Sergio Gonzalez, por su infinita paciencia todos los días, por las charlas, por toda la ayuda, por el intercambio de ideas, por su apoyo siempre;

A los chicos de UGB, por el cariño y aliento con que siempre me ayudaron, por su colaboración en los ensayos de secuenciación y por compartir conmigo su espacio;

A Emmanuel Gabioud por la posibilidad de acceder a los muestreos de campo, por su experiencia y su contacto con productores locales;

Al Laboratorio de Transformación de Residuos, especialmente a Pedro Rizzo, Brian Young y Diana Crespo, por la posibilidad de trabajar junto a ellos y aprender de su experiencia;

A mis amigos y familiares por creen en mi más que yo, por su apoyo, confianza y compañía, por entender el mundo como yo, por los consejos y su gran sabiduría;

A las personas que conocí gracias a mi paso por el IABiMo y de las cuales no sólo he aprendido sino que me han enriquecido con su amistad. Son ellos, sin duda, el mayor tesoro que me llevo;

Al IABiMO y sus directivos, por abrirme sus puertas, por el espíritu abierto y colaborativo;

Al CONICET, por haberme otorgado la beca doctoral;

Y finalmente a la Universidad de Buenos Aires y a sus docentes, que abre sus puertas para formar profesionales de forma gratuita y con enseñanza de calidad.

**Los resultados de esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:**

**Pin Viso N.**, Redondo E., Díaz Carrasco JM., Redondo L., Sabio y García J., Fernández Miyakawa M., MD Farber. 2021. Geography as non-genetic modulation factor of chicken cecal microbiota. PLoS ONE 16(1):e0244724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244724>

Díaz Carrasco JM., Redondo EA., **Pin Viso ND.**, Redondo LM., Farber MD., ME. Fernández Miyakawa. 2018. Tannins and Bacitracin Differentially Modulate Gut Microbiota of Broiler Chickens. BioMed Research International 2018:1879168. <https://doi.org/10.1155/2018/1879168>

**Pin Viso N.D.**, Rizzo P.F., Young B.J., Gabioud E., Bres P., Riera N.I., Merino L., Farber M.D., D.C. Crespo. Highly diverse soil bacterial communities conceal the potential risk of poultry waste as soil amendment. Pedosphere. Enviado.

Rizzo P.F, Young B.J., **Pin Viso N.**, Carbajal J., Martínez L.E., Riera N.I., Bres P.A., Beily M.E., Barbaro L., Farber M., Zubillaga M.S., D.C. Crespo. Integral approach to the evaluation of poultry manure, compost and digestate: amendment characterization, mineralization, and effects in soil and intensive crops. Applied Soil Ecology. Enviado

# Índice

<b>Introducción</b> .....	1
Breve historia de la producción aviar en Argentina.....	2
Sistemas de producción aviar en Argentina.....	4
Residuos de la producción aviar.....	6
Estudio de las comunidades microbianas.....	9
Microbiota vs Microbioma.....	10
<b>Objetivo general</b> .....	13
<b>Objetivos específicos</b> .....	13
<b>Estructura de la tesis</b> .....	14
<b>Capítulo 1: La geografía como factor de modulación no genético de la microbiota cecal de pollo</b> .....	15
1 Introducción.....	16
1.1 Hipótesis.....	18
2 Materiales y Métodos.....	19
2.1 Adquisición de sets de datos públicos de ensayos experimentales.....	19
2.2 Muestras de microbiota cecal de Argentina proveniente de granjas comerciales.....	19
2.3 Extracción de ADN y secuenciación.....	22
2.4 Análisis de la Comunidad Microbiana.....	22
2.5 Análisis estadístico de los resultados.....	24
3 Resultados.....	25
3.1 La locación geográfica como modulador de la microbiota cecal.....	25
3.1.1 Enfoque “open reference” o “abierto”.....	25
3.1.2 Enfoque “close reference” o “cerrado”.....	29
3.2 Caracterización de la microbiota cecal de Argentina.....	33
4 Discusión.....	38
5 Conclusión.....	45

<b>Capítulo 2: Los promotores de crecimiento como factores de modulación del ambiente productivo</b> .....	47
1 Introducción.....	48
1.1 Microbiota intestinal y producción aviar.....	48
1.2 Alternativas al uso de antibióticos.....	51
1.3 Hipótesis.....	52
2 Materiales y Métodos.....	53
2.1 Ensayo 1: Ensayo bajo condiciones controladas.....	53
2.1.1 Muestras de microbiota cecal del Ensayo 1.....	54
2.2 Ensayo 2: Ensayo en Granja Comercial.....	54
2.2.1 Muestras de microbiota cecal del Ensayo 2.....	56
2.2.2 Muestras de microbiota de cama de pollo del Ensayo 2.....	56
2.3 Ensayo 3: Muestreo de camas de pollo de granjas comerciales.....	56
2.4 Extracción de ADN y secuenciación.....	57
2.5 Análisis de la Comunidad Microbiana.....	59
3 Resultados.....	61
3.1 Ensayo 1: Ensayo bajo condiciones controladas.....	61
3.2 Ensayo 2: Ensayo en Granja Comercial.....	68
3.2.1 Caracterización de ciegos.....	72
3.2.2 Caracterización de cama de pollo.....	78
3.3 Ensayo 3: Muestreo de camas de pollo en granjas comerciales.....	84
3.4 Comparación de microbiota de camas de los Ensayos 2 y 3.....	90
4 Discusión.....	92
4.1 Ensayo 1: Ensayo bajo condiciones controladas.....	92
4.2 Ensayo 2: Ensayo en Granjas Comerciales.....	97
4.3 Camas de pollos.....	99
4.3.1 Camas de pollo provenientes del Ensayo 2.....	99
4.3.2 Camas de pollo provenientes del Ensayo 3.....	104
5 Conclusiones.....	105

<b>Capítulo 3: Los residuos avícolas como enmiendas orgánicas</b> .....	108
1 Introducción.....	109
1.1 Impacto ambiental.....	109
1.2 Procesos de biotransformación de residuos.....	112
1.2.1 Compostaje.....	112
1.2.2 Digestión Anaeróbica.....	117
1.3 Hipótesis.....	120
2 Materiales y métodos.....	121
2.1 Residuos crudos.....	121
2.2 Efecto de la aplicación de residuos avícolas sobre suelos agrícolas.....	121
2.3 Residuos tratados.....	123
2.3.1 Guano crudo.....	123
2.3.2 Guano compostado.....	123
2.3.3 Guano digerido anaeróbicamente.....	124
2.4 Análisis.....	124
2.4.1 Análisis de las propiedades fisicoquímicas.....	124
2.4.2 Ensayo de fitotoxicidad.....	125
2.4.3 Análisis de la estructura de las comunidades microbianas.....	127
2.4.3.1 Extracción de ADN.....	127
2.4.3.2 Amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S y secuenciación por Illumina.....	127
2.4.3.3. Análisis de amplicones del gen ARNr 16S.....	128
2.4.3.4 Accesoión de las secuencias.....	129
2.4.4 Análisis estadísticos.....	129
3 Resultados.....	131
3.1 Residuos crudos.....	131
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas de los residuos crudos.....	131
3.1.2 Ensayo de fitotoxicidad.....	132
3.1.3 Estructura de las comunidades bacterianas de residuos avícolas....	133
3.1.4 Efectos de la aplicación de residuos avícolas en suelos agrícolas...	138
3.1.4.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo.....	138

3.1.4.2 Estructura de comunidades bacterianas de suelos.....	139
3.2 Residuos tratados.....	143
3.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	143
3.2.2 Estructura de las comunidades bacterianas de residuos tratados....	145
4 Discusión.....	148
4.1 Residuos crudos.....	148
4.2 Efectos de la aplicación de residuos avícolas en suelos agrícolas.....	154
4.3 Residuos tratados.....	162
5 Conclusiones.....	165
<b>Conclusiones Generales.....</b>	<b>168</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>172</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>196</b>
Índice de Tablas.....	210
Índice de Figuras.....	212

# Introducción

## **Breve historia de la producción aviar en Argentina**

El inicio de la producción aviar en Argentina se remonta a la década de 1850 cuando, bajo la presidencia de Justo José de Urquiza, se ingresan al país las primeras aves traídas de Europa con el fin de desarrollar la actividad en la provincia de Entre Ríos (García Trevin, 2015).

En la década de 1920, aprovechando las conexiones ferroviarias, la actividad comienza a crecer y se empiezan a realizar envíos de pollos vivos y huevos hacia las grandes ciudades del país (Motta, 2017).

En las primeras décadas del siglo XX la producción era estacional y el consumo de pollo era considerado un lujo ocasional. Antes de 1960 el consumo de esta carne no llegaba a los 3 Kg/habitante/año.

A partir de 1960 comienza una nueva revolución del sector, aparecen nuevas líneas genéticas pesadas (dedicadas a la producción de carne) y livianas (enfocadas en la producción de huevos) y además, comienzan a darse importantes cambios tecnológicos, implementándose políticas crediticias que permitieron a los productores la inversión en nuevas granjas de incubación, recría y engorde, así como también en plantas de procesamiento de alimentos y frigoríficos aviares (García Trevin, 2015).

Las nuevas líneas demandaban un alimento acorde a su capacidad de crecimiento por lo que comienza a utilizarse alimento balanceado, es decir aquel que se adapta a las necesidades nutricionales de las aves. Surgen así nuevas fábricas locales de producción de alimento balanceado que aplicaron nuevas tecnologías y nuevos conceptos, logrando que el consumo anual por habitante pasara de 4 Kg a 8 Kg en 1965, duplicando su valor. Hacia 1970 el consumo alcanzaba valores de 10 Kg/habitante/año y pasa de ser consumido en

fiestas y ocasiones especiales, a incorporarse a la alimentación familiar con una frecuencia de casi una vez por semana (Cincap, 2016).

Durante las décadas de 1970 y 1980 comienza el proceso de integración vertical y coordinación vertical, redundando en mayor eficacia sistémica y mayor competitividad tanto a nivel local como internacional. El término integración vertical hace referencia a que la propiedad de los bienes en las distintas fases productivas está en una misma firma, es decir, propietarios de varios eslabones productivos. El término coordinación vertical se refiere a otra forma de organización, mediada por contratos entre los diferentes actores de la cadena productiva (Gange *et al.*, 2019).

Este nuevo concepto de integración y coordinación vertical, bajó aún más el precio al consumidor final, consolidó el consumo en más de 14 Kg/habitante/año y aumentó la competitividad. Así, los productos pollo y huevo se posicionaron como las proteínas animales de más bajo precio al público (Cincap, 2016).

En los años 1990 se dio una reconversión tecnológica y un aumento de la escala productiva. Esto derivó en un proceso de concentración que redujo el número de productores. El exceso de oferta llevó el consumo a 26 Kg/habitantes/año.

En la actualidad nos encontramos con una actividad de alto impacto agroindustrial, tanto en las economías regionales como a nivel nacional, con alta presencia en el mercado interno (Motta, 2017). Los consumos per cápita de carne aviar se vieron incrementados notablemente en los últimos años, pasando de valores de 26,6 Kg/habitante/año a finales del año 2000, hasta valores de 45,99 Kg/habitante/año en 2020 (MAGyP, 2021).

En los últimos 20 años, la producción nacional de carne aviar creció un 240% pasando de valores de 0,9 millones de toneladas en el año 2000, a 2,3 millones de toneladas en 2020. Las áreas de mayor producción se encuentran en las provincias de Entre Ríos

(51,2%) y Buenos Aires (36%) según datos del año 2020 (MAGyP, 2021), seguidas por las provincias de Santa Fe (4,2%), Córdoba (3,8%) y Río Negro (2,6%), y en menor proporción las provincias de Mendoza, Salta, Jujuy y La Rioja (con menos del 1% de la producción cada una).

Por su parte, la capacidad de exportación de productos consumibles (pollo entero, trozado, pechuga salada y procesados) fue de aproximadamente 229 mil toneladas anuales en el año 2020, siendo los principales países destinatarios: China (27%), Sudáfrica (16%), Chile (7%), Rusia (6%) y Hong Kong (4%). El 40% restante corresponde a más de 45 países entre los que se encuentran Perú, Angola, Francia y Singapur (MAGyP, 2021).

## **Sistemas de producción aviar en Argentina**

El sector avícola en la Argentina está formado principalmente por empresas familiares, que poseen diferente tamaño y volumen de producción, y cuya producción se destina mayormente al mercado interno.

Según un relevamiento realizado en 2019 por la Dirección de Porcinos, Aves y Animales de Granja del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, junto a la colaboración del Programa de Aves de SENASA y participación del sector privado (MAGyP, 2020), donde participaron más de 2.300 productores y se relevaron datos de más de 2.700 granjas, se observó que casi el 84% de los productores se dedica a la avicultura como actividad principal. El 88% de los productores manifestaron que su granja era propia (no alquilada) y más del 66% residía en la granja.

El 74% de las granjas encuestadas poseía menos de 4 galpones, contabilizándose un total de más de 10.500 galpones relevados en la encuesta. Alrededor del 74% de los

mismos habían sido construidos en las décadas de 1990, 2000 y 2010. El 80% fueron del tipo abierto o convencional y, dentro de los de ambiente controlado, el 37% fueron túneles oscurecidos o “*blackout*”. En estos galpones oscurecidos se brindan mejores condiciones ambientales y, por lo tanto, se pueden criar un mayor número de animales por metro cuadrado.

En los galpones convencionales la ventilación y los implementos son manuales o automatizados. Pueden poseer sistemas de comederos tipo tolva (23% de los galpones relevados) o automáticos (77%), sistemas de bebedero tipo niple (97%) y manejo de cortinas manual o levanta cortinas. Algunos, además, cuentan con ventiladores y sistema de riego por aspersión (Becciu y Estévez Magnasco, 2012).

En los galpones *blackout* se restringe el ingreso de luz natural y se limita la luminosidad artificial, se cuenta con sistemas de ventilación que poseen extractores en uno de los extremos del galpón y se regula la temperatura interna con sistemas de aspersión y paneles evaporativos. Permiten mantener un ambiente controlado, acorde a las necesidades de las aves a medida que cambia su edad, mejorando el bienestar animal (Menichelli *et al.*, 2015).

La mayoría de estas granjas realizan una cría convencional de las aves, sin embargo, las demandas del mercado, en relación a productos alternativos que representan el imaginario de la producción “a campo” y de “calidad”, ha aumentado en los últimos años.

Existen diferentes tipos de producciones alternativas a la cría convencional. Por un lado, el modelo campero, utiliza líneas de crecimiento lento y rusticidad manifiesta, con un manejo que contempla períodos de confinamiento de las aves y otros de pastoreo, con una alimentación balanceada a base de granos.

Por su parte, la producción de pollos ecológicos u orgánicos se refiere a la realizada en establecimientos que, a diferencia de los anteriores, cumplen con las pautas requeridas por SENASA y poseen una certificación oficial. Los alimentos utilizados deben elaborarse con materias primas también certificadas como ecológicas u orgánicas, granos certificados que provengan de cultivos no transgénicos y no deben utilizarse aditivos dietarios antibióticos. Los animales utilizados pueden incluir líneas comerciales pero siempre respetando las características del proceso de crianza. Este tipo de producción presenta mayores costos que se reflejan en sobrepuestos en los productos finales, ya sean huevos o carne aviar (MAGyP, 2009).

### **Residuos de la producción aviar**

Lamentablemente, el aumento de la producción del sector avícola en Argentina no ha sido acompañado por un proceso de adecuación de la gestión de los residuos que produce. Al aumentarse el número de animales por galpón, el número total de granjas y los volúmenes de producción de huevos y pollos parrilleros, ha aumentado también el volumen de excretas generadas. Por eso, resulta imprescindible que, en el marco de una producción moderna y eficiente, se destinen tiempo y recursos a la gestión de los residuos de origen animal (Maisonave *et al.*, 2015).

Los dos residuos más importantes que genera la producción aviar son el guano de gallinas y la cama de pollo. El término guano hace referencia a las heces producidas por las gallinas ponedoras, mientras que la cama de pollo es un material que se introduce en el galpón de pollos parrilleros estando vacío, limpio y desinfectado.

El guano es removido de los galpones convencionales con una frecuencia variable según el manejo de cada productor. De acuerdo con lo establecido por las Resoluciones N° 546/2010, N°106/2013 y su modificatoria N° 1699/2019 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), el guano se debe remover totalmente una vez por año (vacío sanitario) manteniendo este vaciado del galpón por un mínimo de 10 días. Una vez removido, el guano es utilizado principalmente como enmienda orgánica. Entre los productores avícolas y agrícolas de la Argentina, este tipo de aplicación es la más difundida, si bien su uso se realiza sin conocer la composición fisicoquímica del residuo ni contemplando un plan de manejo de nutrientes que considere un balance entre los que aporta el guano y los que requiere el cultivo (Maisonave *et al.*, 2018).

La cama de pollo, como se mencionó anteriormente, es un sustrato que se coloca sobre el suelo de los galpones de producción. Está compuesta por materiales como cáscara de arroz, virutas de madera, cáscara de girasol, maní u otros materiales, siendo su principal característica el poseer un bajo contenido de humedad y una gran capacidad de absorción de agua. La finalidad es brindar a las aves aislamiento térmico del piso, evitando que pierdan temperatura por las patas, además de aislamiento mecánico, ya que el contacto de las aves con la superficie dura del piso podría provocarles lesiones, pero principalmente su finalidad es proveer a los animales de una superficie seca donde la humedad de las excretas sea absorbida (Irisarri, 2013).

A medida que el ciclo de producción transcurre, la cama absorbe la humedad del ambiente, proveniente sobre todo de las deyecciones de las aves, mientras se mezcla con plumas, restos de alimento y agua de bebida. Una cama húmeda, ya sea generada por un mal manejo del ambiente del galpón, excesiva cantidad de animales, material inadecuado de cama u otros factores, puede provocar lesiones en las aves (Wang *et al.*, 2016).

A su vez, la cama contiene gran cantidad de microorganismos provenientes de diferentes fuentes. Principalmente, se encuentra gran cantidad de bacterias provenientes del tracto gastrointestinal de las aves y, en menor medida, aquellas propias del material del que se compone la cama, así como también de los aportes realizados mediante transporte por el aire, personal y equipo que entra al galpón (Almada *et al.*, 2016).

La reutilización de la cama es una práctica común en la industria avícola y, en este sentido, la resolución de SENASA N° 1699/2019 establece la obligatoriedad de las granjas de engorde de cambiar la cama, de forma completa, una vez al año o cada cinco crianzas, además de deber realizar una limpieza y desinfección profunda del establecimiento.

Antiguamente, la cama de pollo se utilizaba para alimentar al ganado bovino, uso que está prohibido actualmente por el artículo 3 de la Resolución N° 1389/2004 de la ex Secretaría de Agricultura, Ganadería Pesca y Alimentos, para evitar la potencial transmisión de Encefalopatía Espongiforme Bovina, y en la actualidad es utilizada, fundamentalmente, como abono de pasturas y cultivos extensivos para aumentar su producción (Almada *et al.*, 2016).

La aplicación de guano o de cama directamente en el campo puede dar lugar a potenciales problemas de salud ambiental y humana, ya que la misma podría contener residuos químicos (productos farmacéuticos veterinarios) y/o microbiológicos (parásitos, virus y bacterias). Ambos residuos son los principales reservorios de patógenos que afectan la salud de las aves y, por otra parte, presentan microorganismos que pueden representar un peligro para la salud del hombre.

## **Estudio de las comunidades microbianas.**

Los microorganismos (ej. bacterias) están presentes en una amplia variedad de hábitats, incluyendo ambientes extremos con condiciones de alta salinidad, acidez o temperaturas extremas. Estos microorganismos presentan una gran diversidad y tienen un rol esencial en la mayoría de los procesos biológicos que se producen en los ecosistemas (Whitman *et al.*, 1998).

La clasificación taxonómica de estos microorganismos, en el pasado dependía de su aislamiento y cultivo para poder estudiar sus características morfológicas, fisiológicas y los requerimientos nutricionales que presentaban. En la actualidad, se sabe que sólo una pequeña porción de estos microorganismos pueden ser cultivados, por lo que el enfoque dependiente de cultivo para el estudio de estas comunidades microbianas presenta serias limitaciones.

El surgimiento de técnicas independientes de cultivo, como los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism), los polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism), las repeticiones cortas en tándem (STR: Short Tandem Repeat), o las repeticiones de secuencia simple (SSR: Simple Sequence Repeat), han permitido su utilización como alternativa a los métodos tradicionales para la caracterización de comunidades microbianas. Sin embargo, estas técnicas no permiten obtener información taxonómica precisa de la composición de las comunidades estudiadas (Abdelfattah *et al.*, 2018).

En los últimos años ha surgido una nueva herramienta para la identificación de microorganismos, basada en la secuenciación de uno o más fragmentos cortos de ADN

provenientes de regiones del genoma que permiten la identificación y diferenciación de especies (Hebert *et al.*, 2003). Los genes que se utilizan para este fin son aquellos que contienen regiones variables entre las especies, simultáneamente con regiones flanqueantes lo suficientemente conservadas como para diseñar cebadores universales que permitan la amplificación de las regiones de interés, logrando amplicones que pueden ser secuenciados mediante secuenciación de segunda generación (NGS por sus siglas en inglés: Next Generation Sequencing) (Kress y Erickson, 2008).

Si bien es posible realizar estos estudios mediante la secuenciación de Sanger, la misma presenta algunas limitaciones ya que se requiere el clonado de los fragmentos y la secuenciación sólo de un número pequeño de clones, dado el tiempo y esfuerzo necesarios para el procesamiento de las muestras. Es por esto, que el desarrollo de las tecnologías de NGS permitió observar un gran avance en el estudio de las comunidades microbianas.

### **Microbiota vs Microbioma.**

Entre las tecnologías “meta-ómicas”, el término metagenómica se refiere a la secuenciación y análisis del conjunto de genomas microbianos que se encuentran presentes en una muestra, lo que se conoce como microbioma. Por su parte, los términos secuenciación masiva de amplicones o “metabarcoding” hacen referencia a la amplificación y secuenciación de una región específica del ADN (ej. el gen ARNr 16S para bacterias, ARNr 18S para gran parte de los eucariontes y regiones ITS para hongos) (Abdelfattah *et al.*, 2018).

El término “metabarcoding” fue introducido por Taberlet *et al.* (2012), quien lo definió como la “identificación automatizada de múltiples especies a partir de una muestra

que contiene organismos completos o ADN degradado” y, por lo tanto, este análisis es capaz de estudiar todos los taxa microbianos presentes en un ambiente, lo que se conoce como microbiota.

En muchas ocasiones el término microbiota ha sido utilizado, equivocadamente, como sinónimo de microbioma. Como se dijo anteriormente, a diferencia del primero, el microbioma hace referencia al estudio del material genético completo de los microorganismos presentes en una muestra. La microbiota se refiere, entonces, al estudio de la composición taxonómica de una comunidad microbiana (Abdelfattah *et al.*, 2018).

El estudio del microbioma permite obtener información tanto de la composición como de las funciones de la comunidad microbiana, mientras que el estudio de la microbiota sólo nos permite contestar preguntas sobre su composición.

La utilización del metabarcoding para caracterizar la composición de las comunidades microbianas incluye desde el muestreo, la extracción de ADN, la amplificación de las secuencias de interés, su secuenciación y el análisis correspondiente.

El muestreo es uno de los pasos más importantes ya que determinará la adecuada representación de la comunidad microbiana. Así mismo, tanto la extracción de ADN como su amplificación, pueden conducir a desvíos que afecten los resultados obtenidos (Thomas *et al.*, 2012). Podemos mencionar, por ejemplo, desde contaminaciones hasta desvíos introducidos por los reactivos utilizados o por las técnicas de extracción empleadas, así como aquellos generados debido al proceso de amplificación, que puede resultar selectivo y modificar la diversidad microbiana detectada en las muestras, por sobre o subestimación de la diversidad presente.

En relación a la secuenciación, Illumina® (San Diego, California) representa la plataforma más utilizada en la actualidad para el estudio de las comunidades microbianas,

si bien la misma puede realizarse en diferentes plataformas. El número de lecturas obtenidas en estas plataformas es muy variable, lo que impacta en el número total de muestras que pueden ser multiplexadas en una misma corrida de secuenciación. En este sentido, el número de lecturas obtenidas por plataforma es relativamente constante, por lo que el número de muestras a secuenciar por corrida estará basado en la profundidad de secuenciación que se necesite por muestra para lograr una correcta captura de la diversidad microbiana presente.

Por último, el análisis de las secuencias obtenidas requiere de programas específicos y de capacidad computacional acorde al tamaño de los datos analizados. Existen una variedad de herramientas bioinformáticas para dicho análisis, entre las que se destacan QIIME, MOTHUR y UPARSE como las más utilizadas (Caporaso *et al.*, 2010; Edgar, 2013; Schloss *et al.*, 2009).

El análisis puede dividirse en dos etapas. Por un lado, en la generación de las tablas de unidades taxonómicas operativas (OTUs) o tablas de variantes de las secuencias de amplicones (ASVs), que incluye el pre-procesamiento de las secuencias crudas (corrección de errores, filtrados por calidad y detección de secuencias quiméricas), selección de secuencias representativas y su posterior asignación taxonómica utilizando bases de datos curadas y, por otro lado, los análisis estadísticos de dichas tablas de OTUs o ASVs obtenidas, con la caracterización de sus parámetros de diversidad alfa y beta. La diversidad alfa representa la diversidad intrínseca de cada muestra, mientras que la diversidad beta representa la diversidad entre muestras diferentes.

## Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es abordar el estudio de las comunidades microbianas implicadas en diferentes etapas del proceso productivo aviar, con el fin de caracterizar los diversos factores que modulan su composición, para diseñar intervenciones con un enfoque sustentable, que permitan mejorar el rendimiento productivo y transformar los residuos generados en subproductos.

## Objetivos específicos

1. Determinar la importancia de la locación geográfica como modulador de la composición de la microbiota de aves de corral;
2. Caracterizar la “microbiota local” cecal de pollo de Argentina;
3. Evaluar el impacto del sistema de producción en muestras de pollos de Argentina, comparando aquellas que provienen de ensayos experimentales o granjas comerciales;
4. Caracterizar la microbiota intestinal en respuesta al uso de un taninos como promotor de crecimiento alternativo, en ambientes experimentales y comerciales;
5. Caracterizar la microbiota presente en la cama de pollo de ambientes productivos, consecuencia de la adición de taninos o antibióticos en la dieta;
6. Caracterizar residuos avícolas, crudos y tratados, a escala experimental;
7. Evaluar el efecto de la aplicación de residuos avícolas crudos sobre suelos agrícolas.

## Estructura de la tesis

La presente tesis se estructura en tres grandes áreas: i) el estudio de la microbiota en el contexto del ambiente productivo, ii) el estudio de los residuos generados en la producción avícola y la transformación de los mismos para su utilización como subproductos, y iii) el estudio del impacto de la aplicación de estos residuos en el ambiente al ser utilizados como enmiendas orgánicas en suelos agrícolas.

El estudio de la microbiota en el contexto del ambiente productivo será abordado en los capítulos 1 y 2. El capítulo 1 aborda el impacto de diferentes factores sobre la composición de la microbiota, haciendo hincapié en el efecto del origen geográfico de los datos así como en la diferenciación existente entre los datos provenientes de ensayos experimentales, que intentan imitar el ambiente productivo, y aquellos datos provenientes de granjas comerciales.

En el capítulo 2 se estudia el efecto de diferentes aditivos en la dieta de las aves, tanto en ensayos experimentales bajo condiciones controladas como en establecimientos productivos, a través de la descripción de la composición de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal de las aves y en la cama de pollo.

Finalmente, en el capítulo 3 se abordan tanto el estudio de las comunidades microbianas presentes en los residuos de la producción aviar (guano y cama de pollo) y las modulaciones que las mismas sufren luego de la biotransformación de los residuos para la obtención de enmiendas seguras y el efecto de su aplicación en los suelos como fertilizantes orgánicos.

# Capítulo 1

## **La geografía como factor de modulación no genético de la microbiota cecal de pollo**

*Everything is everywhere, but the environment selects*

Lourens Baas Becking

1895-1963, Países Bajos

## 1 Introducción

El tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos alberga una microbiota sumamente diversa dominada por bacterias, que influencia tanto la salud del animal como su rendimiento productivo, afectando su crecimiento. Una microbiota saludable permite una mejor utilización de los nutrientes y promueve la exclusión competitiva, evitando la colonización de bacterias patógenas (Kohl, 2012).

Se ha demostrado que la composición de la microbiota del TGI puede verse modificada dependiendo de algunos factores como ser la dieta y los aditivos de la misma, la edad, el genotipo del hospedante, así como también la porción intestinal que se evalúe, entre otros (Shang *et al.*, 2018). Algunas de estas variables han sido estudiadas en más profundidad que otras, como el efecto de la edad de los animales o los cambios que se observan en las diferentes regiones gastrointestinales.

Algunos autores consideran que la edad de las aves tiene un impacto importante en la composición de la microbiota del TGI (Pourabedin *et al.*, 2015), siendo mayor que el impacto de la dieta. En relación a las diferentes regiones del TGI, algunos estudios encontraron que las densidades de las poblaciones bacterianas aumentan desde el área proximal a la distal (Richards *et al.*, 2005); sugiriendo un mayor efecto debido a la región del TGI, encontrando valores más altos de riqueza y diversidad en el contenido cecal que en otras regiones (buche, molleja, duodeno, yeyuno e íleon) (Choi *et al.*, 2014; Mohd Shaufi *et al.*, 2015; Stanley *et al.*, 2012).

Otros factores que afectan la composición de la microbiota son los aditivos alimentarios. Existe una variedad de aditivos con presuntos efectos antimicrobianos y/o

promotores del crecimiento que se utilizan como aditivos dietarios de aves de corral durante el engorde comercial, incluidos antibióticos (administrados en dosis subterapéuticas) y nuevas alternativas como prebióticos, probióticos, ácidos orgánicos y extractos de plantas (Huyghebaert *et al.*, 2011; Redondo *et al.*, 2014; Verstegen y Williams, 2002; Yang *et al.*, 2019).

Los efectos de estos aditivos en la comunidad microbiana del TGI siguen siendo en gran parte desconocidos, aunque se sabe que logran reducir la población de bacterias patógenas y el uso de nutrientes por parte de la microbiota, mejorando así la utilización de vitaminas y otros nutrientes por parte del hospedador (Danzeisen *et al.*, 2011).

En los últimos años, ha surgido un nuevo enfoque que considera la influencia del origen geográfico de las muestras en la composición de la microbiota. Por ejemplo en humanos, la geografía logró explicar parte de la variabilidad observada en comunidades de bacterias intestinales (Fallani *et al.*, 2010; Yatsunenکو *et al.*, 2012) y, en aves, se ha demostrado que algunos parámetros ambientales parecen ser los factores más importantes en la modulación de la microbiota (Godoy-Vitorino *et al.*, 2012; Hird *et al.*, 2014). Videnska *et al.* (2014) mostraron que la composición de la microbiota fecal de gallinas ponedoras y aves de corral, variaba entre muestras de diferentes países de Europa, como Eslovenia, Hungría, Croacia y República Checa. Recientemente también, al comparar muestras de cinco regiones de gran altitud de China, Zhou *et al.* (2016) determinaron que la composición de la microbiota intestinal de pollos tibetanos era alterada por su origen.

## 1.1 Hipótesis

A partir de esta información hipotetizamos que la locación geográfica es un factor modulador clave de la microbiota del TGI. En este sentido, consideramos a la geografía en un sentido amplio, en términos del marco teórico de la “geografía humana”, superando la dimensión territorial característica de la visión de la geografía física, incluyendo entonces en su definición fenómenos sociales, económicos y políticos y de su relación con el territorio (Mendoza Vargas, 2013).

La locación geográfica sería entendida entonces como un espacio multidimensional que podría explicar los flujos e interacciones entre distintos factores como ser el clima, el manejo de las granjas (incluyendo las intervenciones en salud animal, su nutrición, el manejo de los alimentos y de la cama de los pollo) y el entorno socioeconómico y cultural.

Para probar esta hipótesis, re-analizamos datos públicos que se encuentran disponibles en bases de datos como NCBI y MG-RAST, que corresponden a ocho países diferentes, así como datos locales, con el objetivo de :

- Determinar la importancia de la locación geográfica como modulador de la composición de la microbiota de aves de corral;
- Caracterizar la “microbiota local” cecal de pollo de Argentina;
- Evaluar el impacto del sistema de producción en muestras de pollos de Argentina, comparando aquellas que provienen de ensayos experimentales o granjas comerciales.

## **2 Materiales y Métodos**

### **2.1 Adquisición de sets de datos públicos provenientes de ensayos experimentales.**

Para poder comparar la composición de la microbiota del TGI de pollos de diferentes locaciones geográficas, se utilizaron conjuntos de datos de secuenciación masiva de amplicones del gen ARN ribosomal 16S que provenían de ensayos experimentales (ET) realizados en diferentes países. Estos conjuntos de datos fueron obtenidos de las bases de datos públicas del NCBI (Sequence Read Archive) y MG-RAST y su origen correspondió a ocho países diferentes incluyendo Argentina. Estos datos pueden ser observados en la Tabla 1.1. Todos estos datos fueron descargados y re-analizados con el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) v1.9.1 (Kuczynski *et al.*, 2012), utilizando todas las muestras como un único conjunto de datos.

### **2.2 Muestras de microbiota cecal de Argentina proveniente de granjas comerciales.**

Adicionalmente, se seleccionaron 10 granjas comerciales (CF) de Entre Ríos y Buenos Aires, clasificadas de acuerdo a las prácticas de cría que en ellas se realizaban como: avicultura convencional (CP) o granja agroecológica (AE); con el fin de caracterizar en mayor profundidad la “microbiota local” de Argentina.

**Tabla 1.1. Conjuntos de datos de secuenciación masiva de amplicones del gen ARN ribosomal 16S utilizados para comparar la composición de la microbiota del TGI de pollos en función de la locación geográfica.**

Fuente/ID	Locación Geográfica	Porción Intestinal	Edad (días)	Línea Genética	Región secuenciada	Dieta	Kit de Extracción	Plataforma	Referencia
<b>NCBI</b>									
PRJEB9198	GER	Ciego	25	Ross	Completo	SCD, MCP	Qiagen	Roche	Witzig <i>et al.</i> , 2015
SAMN03092832-39	MAL	Ileon/Ciego	21/42	Cobb	V3	SCD	Qiagen	Illumina	Mohd Shaufi <i>et al.</i> , 2015
SRP045877	CRO	Fecal	21	Ross/Cobb	V3-V4	SCD	Qiagen	Roche	Videnska <i>et al.</i> , 2014
SRP045877	SLO	Fecal	21	Ross/Cobb	V3-V4	SCD	Qiagen	Roche	Videnska <i>et al.</i> , 2014
SRP045877	HUN	Fecal	21	Ross/Cobb	V3-V4	SCD	Qiagen	Roche	Videnska <i>et al.</i> , 2014
SAMN03161778-871	USA	Ciego	42	Ross/Cobb	V1-V3	SCD, OA	Griffiths 2000	Roche	Oakley <i>et al.</i> , 2014
<b>MG-RAST</b>									
4614960.3	AUS	Ciego	25	Cobb	V1-V3	SCD	Yu & Morrison 2004	Roche	Stanley <i>et al.</i> , 2015
<b>DISPONIBLE BAJO PEDIDO</b>									
--	ARG-ET1	Ciego	26	Cobb	V3-V4	SCD, Bac, Tan	Qiagen	Illumina	Díaz Carrasco <i>et al.</i> , 2018
--	ARG-ET2	Ciego	22	Cobb	V3-V4	SCD, Tan	Qiagen	Illumina	Díaz Carrasco Sin publicar

GER: Alemania, MAL: Malasia, CRO: Croacia, SLO: Eslovenia, HUN: Hungría, USA: Estados Unidos, AUS: Australia, ARG-ET1: Argentina-Ensayo Experimental 1, ARG-ET2: Argentina-Ensayo Experimental 2. SCD: Dieta estándar comercial. MCP: Fosfato monocálcico; OA (Ácido Orgánico): ác. fórmico, ác. propiónico, formiato de amonio y ác. grasos de cadena media; Bac: Bacitracina de Zinc en dosis sub-terapéuticas; Tan: Mezcla de taninos derivados de castaña y quebracho. Qiagen: QIAmp DNA Stool Mini Kit. Roche: Roche-454. Illumina: Illumina-MiSeq.

Para ello, se tomaron 27 muestras de contenido cecal, de distintos galpones de las 10 granjas (9 granjas convencionales y 1 granja agroecológica) (Tabla 1.2). Cada muestra estuvo formada por un pool del contenido de los ciegos de 5 animales de cada galpón, tomadas inmediatamente después de su eutanasia realizada por dislocación cervical. Las muestras de ciegos fueron refrigeradas en hielo y luego guardadas a -80°C hasta la realización de las extracciones de ADN.

La participación por parte de los productores en este estudio fue voluntaria y las prácticas con animales aquí reportadas fueron realizadas de acuerdo al protocolo número 20/2010 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del INTA (CICUAE aprobado por la resolución CICVyA No. 14/07), basado en lineamientos internacionalmente reconocidos de “Cuidado y Uso de Animales Experimentales”, como la Guía para el cuidado y uso de animales de agricultura en investigación y enseñanza, 3ra edición, 2010.

**Tabla 1.2. Muestras de microbiota cecal de Argentina de granjas comerciales.**

Muestra	Fuente	Granja	Galpón	Edad (días)	Muestra	Fuente	Granja	Galpón	Edad (días)
CP1	Avicultura convencional	1	1	21	CP11	Avicultura convencional	3	1	21
CP2	Avicultura convencional	1	2	21	CP12	Avicultura convencional	3	2	21
CP3	Avicultura convencional	1	3	21	CP13	Avicultura convencional	4	1	21
CP4	Avicultura convencional	1	4	21	CP14	Avicultura convencional	4	2	21
CP5	Avicultura convencional	1	5	21	CP15	Avicultura convencional	5	1	21
CP6	Avicultura convencional	1	6	21	CP16	Avicultura convencional	6	1	21
CP7	Avicultura convencional	1	1	40	CP17	Avicultura convencional	6	2	21
CP8	Avicultura convencional	1	2	40	CP18	Avicultura convencional	7	1	21
CP9	Avicultura convencional	1	3	40	CP19	Avicultura convencional	7	2	21
CP10	Avicultura convencional	1	4	40	CP20	Avicultura convencional	8	1	21
					CP21	Avicultura convencional	8	2	21
AE1	Granja agroecológica	2	1	115	CP22	Avicultura convencional	9	1	15
AE2	Granja agroecológica	2	2	115	CP23	Avicultura convencional	9	2	15
					CP24	Avicultura convencional	10	1	21
					CP25	Avicultura convencional	10	2	21

### 2.3 Extracción de ADN y secuenciación

El ADN genómico, de todas las muestras de ciego recolectadas, fue extraído a partir de 300 mg de la mezcla de contenidos cecales de cinco animales, utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La concentración de ADN y su pureza fue evaluada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) y luego fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

La región V3-V4 del gen ARN ribosomal 16S fue amplificada a partir del extracto de ADN obtenido. Tanto la construcción de las bibliotecas como la secuenciación fue realizada en Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) usando la plataforma MiSeq de Illumina. Las lecturas pareadas generadas de 300 pb fueron obtenidas utilizando los cebadores universales b341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y Bakt805R (5'-GACTACHVGGGT ATCTAATCC-3').

Todas las secuencias obtenidas en este ensayo fueron depositadas en la base de datos del NCBI bajo el número de acceso del BioProject PRJNA579062.

### 2.4 Análisis de la Comunidad Microbiana

Se realizaron dos análisis separadamente, uno para caracterizar el impacto de la locación geográfica sobre la composición de la microbiota del TGI y otro para describir la microbiota local de Argentina. En ambos análisis las comunidades microbianas fueron analizadas utilizando el programa QIIME v. 1.9.1 con sus parámetros por *default*, excepto que se especifique lo contrario.

Se realizó primeramente un filtrado de calidad de las lecturas utilizando como promedio de calidad *phred* un valor umbral de 20. Se unieron las lecturas paired-end y se identificaron y filtraron posibles secuencias quiméricas con el algoritmo UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Las lecturas de cada ensayo fueron agrupadas luego en unidades taxonómicas operativas (OTUs)

mediante el algoritmo UCLUST (Edgar, 2010) utilizando un valor de similitud de secuencias igual o superior al 97%.

Para el análisis del impacto de la locación geográfica sobre la composición microbiana se utilizaron, para el armado de las OTUs y debido a las diferentes regiones del gen ARNr 16S consideradas, dos enfoques. Uno denominado “close reference” o “cerrado” que compara las lecturas del ensayo con aquellas presentes en una base de datos de referencia, armando las OTUs en función de dichas similitudes y descartando las lecturas que no muestran coincidencia, por lo que la taxonomía asociada a estas OTUs proviene directamente de la secuencia sobre la que cada OTU fue creada; y un segundo enfoque denominado “open reference” o “abierto”, que a diferencia del enfoque anterior utiliza las lecturas que no coinciden con las secuencias presentes en la base de datos, y las agrupa formando OTUs *de novo* en función de la similitud que muestran al ser comparadas entre sí. Posteriormente, dichas OTUs son comparadas con la base de datos GreenGenes v.13.8 para asignarles su clasificación taxonómica.

Este último enfoque fue también el utilizado para la caracterización de la microbiota local de Argentina.

En ambos ensayos, las OTUs se normalizaron usando el método de suma total (total-sum scaling method – el cual divide el número de secuencias de cada OTU por el número de secuencias totales de cada muestra) y aquellas con abundancias relativas menores al 0,005% fueron descartadas.

Para ambos análisis, la diversidad microbiana fue evaluada en las muestras (alfa diversidad) y entre las muestras (beta diversidad) utilizando QIIME. Se caracterizó la alfa diversidad a través de su riqueza (índice de Chao1 y cantidad de OTUs observadas) y a través de la diversidad de la comunidad (índices de Shannon y Simpson). Para la caracterización de la beta diversidad en las comunidades microbianas, se realizó un agrupamiento jerárquico basado en la

disimilaridad de Bray-Curtis, luego de que las abundancias relativas de las OTUs fueran transformadas usando raíz cuadrada, implementando un método promedio para el agrupamiento de microbiotas en el programa RStudio a través del paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2017). Adicionalmente, se utilizó la distancia UniFrac no ponderada (Lozupone y Knight, 2005) para realizar un análisis de coordenadas principales (PCoA).

## 2.5 Análisis estadístico de los resultados

Para comparar la composición de la microbiota del TGI de las muestras de los diferentes países, se realizaron múltiples rarefacciones con recuentos promedios, y las tablas de OTUs fueron analizadas con el programa Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) (Parks *et al.*, 2014), realizando un Análisis de la Varianza - ANOVA - con corrección de Bonferroni, para identificar diferencias en las abundancias relativas de las OTUs. Cada muestra individual de cada país, fue considerada una unidad experimental.

Para identificar diferencias en los índices de diversidad alfa, se realizaron test de Kruskal-Wallis con Mann-Whitney *post-hoc*, corregidos por el método de Bonferroni. En el análisis de los índices de beta diversidad, el agrupamiento de las muestras en el PCoA para cada uno de los factores de la metadata, fue evaluado utilizando el test estadístico multivariado no paramétrico ADONIS en QIIME. Adicionalmente, se realizó un test de Mantel en RStudio, utilizando 999 permutaciones, para evaluar la correlación entre las distancias UniFrac no ponderadas y las distancias geográficas de las muestras de los diferentes países. Las coordenadas geográficas para cada set de datos fueron obtenidas en <https://www.geodatos.net/> y a partir de ellas se calcularon las distancias del semiverseno (haversine distance) utilizando el paquete *geosphere* en R.

Para todos los análisis estadísticos se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

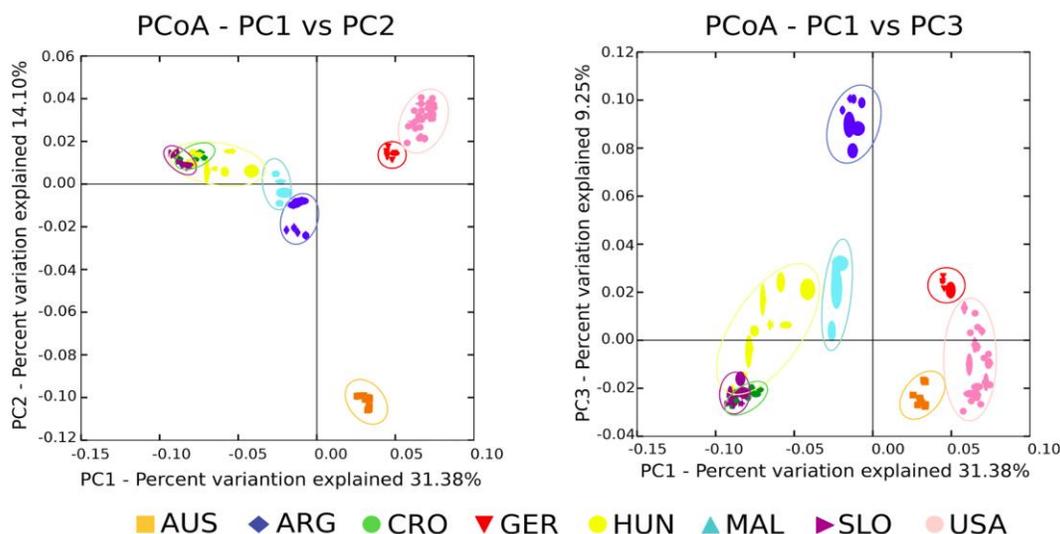
## **3 Resultados**

### **3.1 La locación geográfica como modulador de la microbiota cecal.**

La influencia de la locación geográfica sobre la microbiota del TGI de aves fue evaluada a través de un meta-análisis, comparando la estructura de las comunidades bacterianas presentes en muestras provenientes de ocho países diferentes.

#### **3.1.1 Enfoque “open reference” o “abierto”**

Al realizar el análisis comparativo de los datos descargados de repositorios públicos correspondientes a ocho países diferentes, probamos la influencia de la ubicación geográfica en la modulación de la microbiota del TGI. El agrupamiento de las muestras que surge del análisis de escala multidimensional (PCoA basado en distancias UniFrac no ponderadas del gen de ARNr 16S) reveló grupos distintos asociados a cada país (Figura 1.1). El ajuste que mostraron los datos a los diferentes factores de la metadata evaluados, confirmó a la ubicación geográfica como el principal modulador de la estructura de la comunidad (72,35% de variabilidad observable) (Tabla 1.3). Además, el resultado de la prueba de Mantel mostró una correlación estadísticamente significativa entre la diversidad beta y las matrices de distancia de ubicación geográfica (estadístico de Mantel  $r = 0,4068$ ; Significación =  $1e-04$ ).



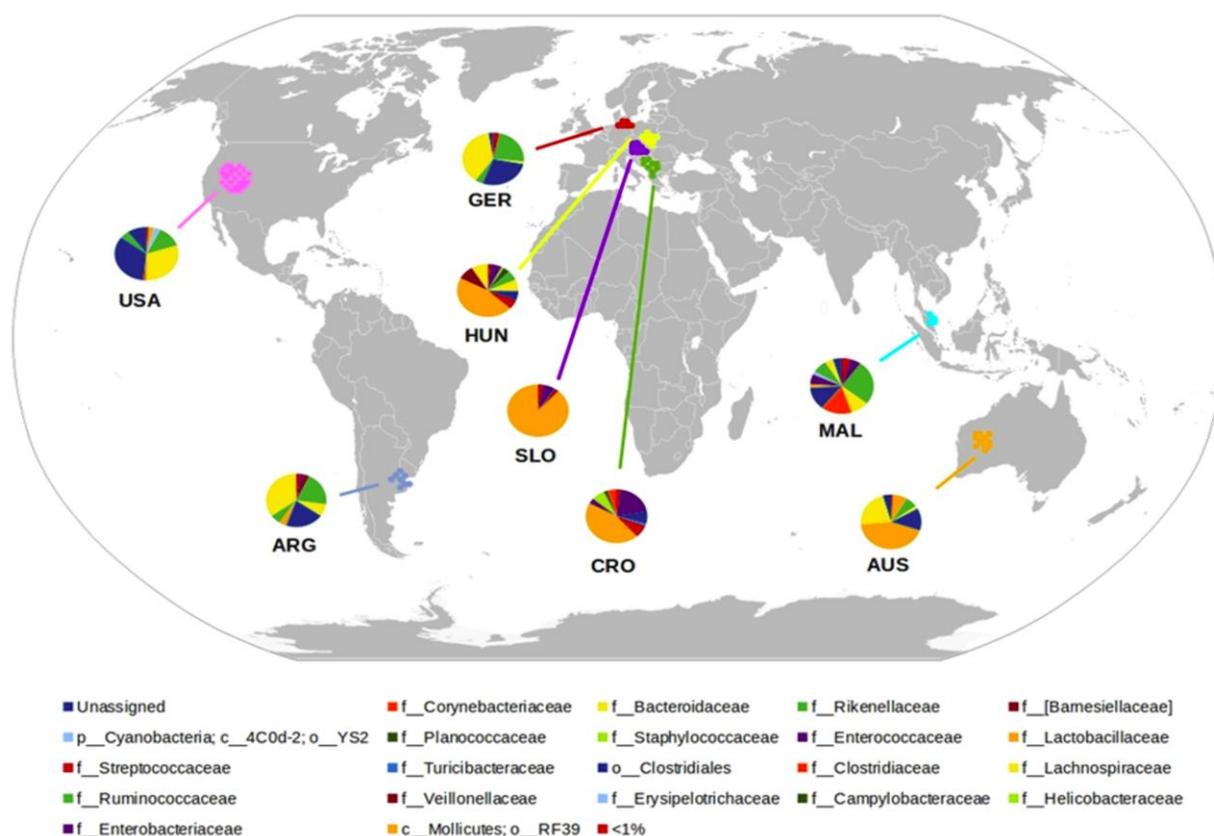
**Figura 1.1. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias UniFrac no ponderadas resultados del análisis abierto u “open reference”.** Microbiota del TGI de muestras de pollos provenientes de diferentes locaciones geográficas designadas como AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malasia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos.

**Tabla 1.3. Ajuste de los diferentes factores de la metadata en el agrupamiento basado en distancias UniFrac no ponderadas.** Se utilizó el análisis estadístico ADONIS sobre los resultados del enfoque abierto u “open reference”.

UniFrac no ponderado	R <sup>2</sup>
Locación Geográfica	0,72
Región secuenciada	0,43
Dieta	0,43
Kit de Extracción de ADN	0,43
Porción Intestinal	0,34
Edad (días)	0,22
Línea genética	0,20
Plataforma	0,11

Significancia estadística identificada para todos los factores ( $p < 0,01$ )

Por otro lado, el uso de métricas de disimilitud de Bray-Curtis en un análisis de agrupamiento de comunidades microbianas a nivel de género arrojó resultados similares (Apéndice 1.1). Por su parte, las abundancias relativas de las OTUs a nivel familiar también apoyan las estructuras comunitarias asociadas con la geografía (Figura 1.2, Apéndices 1.2 y 1.3). Cabe destacar que la presencia de Bacteroidaceae, Lactoballaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y Clostridiaceae explicó las diferencias detectadas entre países (Apéndice 1.3).



**Figura 1.2.** Mapa geográfico de la microbiota del TGI de pollos a nivel familiar resultados del análisis abierto u “open reference”. Colores diferentes fueron utilizados para representar cada taxón individual. Los diferentes países evaluados fueron AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malasia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos. La clasificación taxonómica está descripta como: o\_orden y f\_familia.

Adicionalmente, realizamos un análisis de la microbiota de cada país en cuanto a riqueza y uniformidad. En este sentido, la estructura comunitaria de la microbiota de Malasia fue la más diversa con los valores más altos de índices de diversidad alfa. Por el contrario, la microbiota de Croacia y Eslovenia mostraron los valores más bajos, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. Estos dos países se agruparon juntos tanto al observar su distribución en el PCoA como los valores de los índices de diversidad alfa (Tabla 1.4).

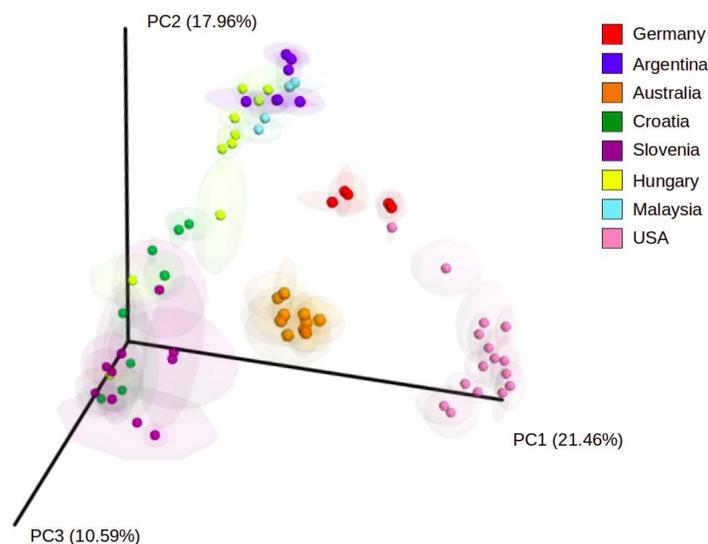
**Tabla 1.4. Índices de diversidad alfa para muestras de pollos correspondientes a las diferentes locaciones geográficas, resultado del análisis abierto u “open reference”.**

<b>Locación Geográfica</b>	<b>OTUs por muestra</b>	<b>Índice Chao1</b>	<b>Diversidad de Shannon</b>	<b>Diversidad de Simpson</b>
Malasia	478,25±29,77 <sup>a</sup>	510,12±25,95 <sup>a</sup>	5,89±0,78 <sup>a</sup>	0,95±0,03 <sup>a</sup>
Argentina	151,86±20,14 <sup>b</sup>	172,22±23,6 <sup>b</sup>	4,80±0,24 <sup>b</sup>	0,92±0,01 <sup>a</sup>
Estados Unidos	114,93±18,13 <sup>bc</sup>	155,97±25,09 <sup>b</sup>	5,02±0,73 <sup>a</sup>	0,90±0,08 <sup>ab</sup>
Australia	124,33±6,09 <sup>c</sup>	124,42±5,07 <sup>c</sup>	4,72±0,44 <sup>ab</sup>	0,91±0,03 <sup>ab</sup>
Alemania	90,54±11,21 <sup>c</sup>	122,37±14,12 <sup>c</sup>	4,22±0,37 <sup>b</sup>	0,86±0,04 <sup>b</sup>
Hungría	61,81±20,88 <sup>d</sup>	89,02±28,09 <sup>c</sup>	3,91±0,71 <sup>bc</sup>	0,87±0,07 <sup>ab</sup>
Croacia	32,3±9,57 <sup>e</sup>	39,97±13,91 <sup>d</sup>	3,28±0,46 <sup>c</sup>	0,84±0,05 <sup>b</sup>
Eslovenia	30,62±4,93 <sup>e</sup>	41,18±8,15 <sup>d</sup>	3,23±0,42 <sup>c</sup>	0,83±0,06 <sup>b</sup>

Medias±DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre países de acuerdo al análisis Kruskal Wallis con Mann-Whitney post-hoc ( $p < 0,05$ ) y corrección de Bonferroni.

### 3.1.2 Enfoque “close reference” o “cerrado”

El ordenamiento de las muestras en el análisis multidimensional PCoA, basado en las distancias UniFrac no ponderadas para el gen ARNr 16S, revelaron la formación de diferentes grupos relacionados con su origen geográfico (Figura 1.3). Las muestras de Eslovenia y Croacia no lograron separarse entre sí, como tampoco las provenientes de Argentina, Hungría y Malasia.



**Figura 1.3. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac no ponderadas resultado del análisis cerrado o “close reference”.** Se designan las diferentes locaciones geográficas de las que provienen las muestras de microbiota del TGI de pollos como AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malasia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos.

Cada factor de la metadata considerado, fue evaluado observándose que la locación geográfica era el principal factor modulador de la estructura de la comunidad (63,25% de la variabilidad observada) (Tabla 1.5).

Adicionalmente, los resultados del test de Mantel mostraron una correlación estadísticamente significativa entre las matrices de distancias de la beta diversidad (UniFrac no ponderadas) y las distancias geográficas (estadístico de Mantel  $r = 0,15224$ , Significancia =  $4e-04$ ).

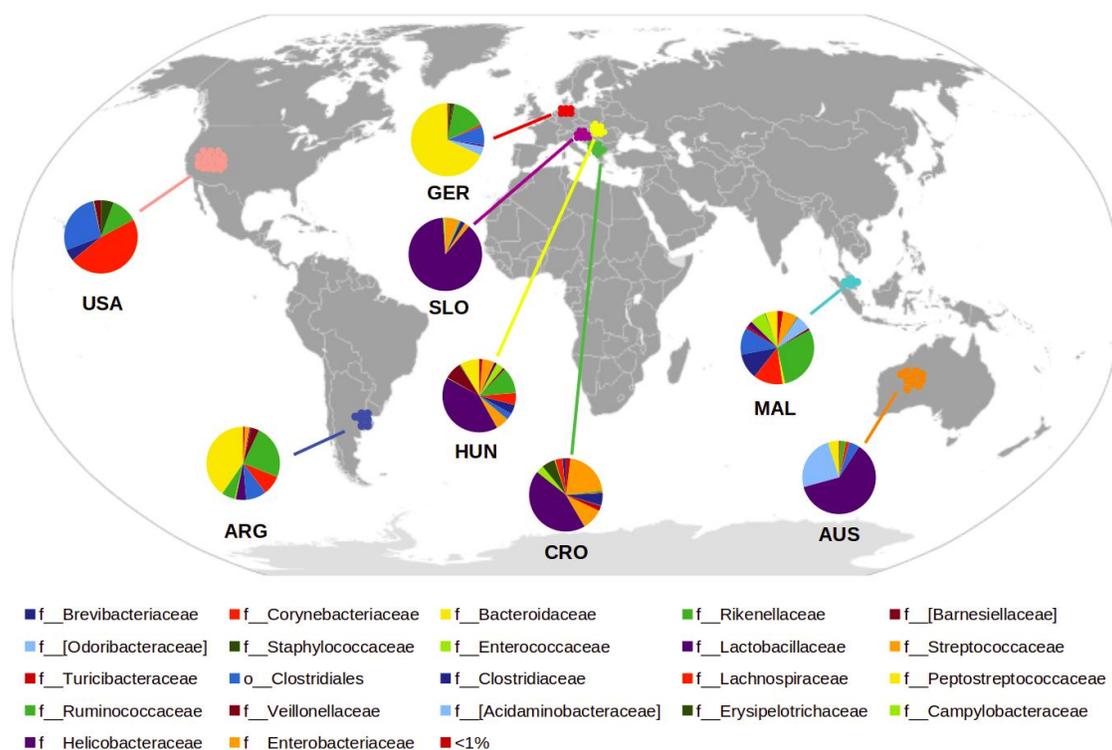
**Tabla 1.5. Ajuste de los diferentes factores de la metadata en el agrupamiento basado en distancias UniFrac no ponderadas.** Se utilizó el análisis estadístico ADONIS a partir de los resultados del enfoque cerrado o “close reference”.

<b>UniFrac no ponderada</b>	<b>R2</b>
Locación Geográfica	0,63
Región secuenciada	0,35
Dieta	0,36
Kit de Extracción	0,33
Porción Intestinal	0,22
Edad (días)	0,20
Línea Genética	0,17
Plataforma de secuenciación	0,11
Significancia estadística identificada para todos los factores ( $p < 0,01$ )	

Para finalizar el análisis de la beta diversidad, se utilizó la disimilaridad de Bray-Curtis para realizar un análisis de agrupamiento (clustering) de las comunidades microbianas a nivel de género obteniéndose resultados similares a los obtenidos en el PCoA de las distancias UniFrac no ponderadas, con clusters particulares para cada origen

geográfico, excepto para los datos provenientes de Croacia, Hungría y Eslovenia (Apéndice 1.4).

La estructura de las comunidades microbianas de los diferentes países fue analizada comparando las abundancias relativas de las OTUs presentes en cada país, a nivel familia. Esta composición mostró diferentes patrones para cada una de las locaciones geográficas de origen (Figuras 1.4 y Apéndices 1.5 y 1.6). Notablemente, la presencia de Bacteroidaceae, Lactobacillaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y Clostridiaceae lograron explicar las principales diferencias observadas (Apéndice 1.6).



**Figura 1.4. Mapa geográfico de la microbiota del TGI de pollos a nivel familia resultado del análisis cerrado o “close reference”.** Colores diferentes fueron utilizados para representar cada taxón individual. Los diferentes países evaluados fueron AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malasia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos. La clasificación taxonómica está descrita como: o\_orden y f\_familia.

Adicionalmente, se realizaron análisis de alfa diversidad de las microbiotas de cada país, evaluándose tanto riqueza como diversidad. En este sentido, la estructura de la comunidad bacteriana de la microbiota de Malasia fue la más diversa mostrando los valores más altos de índices de diversidad. Por el contrario, las microbiotas de Croacia y EE.UU. mostraron los valores más bajos para estos parámetros. Eslovenia y Croacia no mostraron diferencias estadísticas significativas al comparar los índices de riqueza Chao1 y diversidad de Shannon entre sí. Estos dos países se agruparon juntos tanto al observar su distribución en el PCoA, así como en los valores de los índices de diversidad alfa. De manera similar, los valores de alfa diversidad encontrados para Hungría, Argentina y Malasia no lograron diferenciarse estadísticamente (Tabla 1.6).

**Tabla 1.6. Índices de alfa diversidad para muestras de pollo de las diferentes locaciones geográficas, resultado del análisis cerrado o “close reference”.**

<b>Locación Geográfica</b>	<b>OTUs por muestra</b>	<b>Índice de Chao1</b>	<b>Diversidad de Shannon</b>	<b>Diversidad de Simpson</b>
Malasia	590,00±35,38 <sup>a</sup>	621,28±27,78 <sup>a</sup>	5,92±0,92 <sup>a</sup>	0,94±0,04 <sup>a</sup>
Argentina	163,29±32,72 <sup>b</sup>	189,99±43,41 <sup>b</sup>	4,57±0,25 <sup>a</sup>	0,90±0,01 <sup>a</sup>
Hungría	124,70±43,23 <sup>bc</sup>	169,41±58,55 <sup>b</sup>	4,06±0,82 <sup>ab</sup>	0,85±0,10 <sup>abc</sup>
Australia	86,70±15,49 <sup>bcd</sup>	95,61±20,93 <sup>bc</sup>	3,25±0,20 <sup>c</sup>	0,81±0,04 <sup>bcd</sup>
Eslovenia	59,30±10,85 <sup>cd</sup>	74,20±18,98 <sup>cd</sup>	2,81±0,61 <sup>c</sup>	0,72±0,13 <sup>d</sup>
Alemania	44,17±7,33 <sup>de</sup>	56,65±8,40 <sup>cde</sup>	2,90±0,42 <sup>c</sup>	0,69±0,10 <sup>d</sup>
Croacia	42,10±26,50 <sup>e</sup>	55,31±28,10 <sup>de</sup>	3,56±0,81 <sup>bc</sup>	0,84±0,10 <sup>ab</sup>
Estados Unidos	31,39±5,76 <sup>e</sup>	37,59±8,78 <sup>e</sup>	3,09±0,85 <sup>c</sup>	0,74±0,18 <sup>cd</sup>

Se muestran la Media±Desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras, de acuerdo al test Kruskal Wallis con Mann-Whitney post-hoc ( $p < 0,05$ ) y corrección de Bonferroni.

### **3.2 Caracterización de la microbiota cecal de Argentina**

Dadas las diferencias en la composición de las muestras de los diferentes países evaluados, se prosiguió con la caracterización de la “microbiota local” de ciegos de aves de producción de Argentina. Para tal fin se utilizaron los datos provenientes de dos categorías: aquellos obtenidos en ensayos experimentales (ET) y aquellos que provenían de granjas comerciales (CF). Los datos provenientes de CF contemplaban, a su vez, dos posibilidades: que las mismas hayan sido obtenidas en granjas de avicultura convencional (CP) o que provinieran de granjas agroecológicas (AE).

Dentro de las muestras correspondientes a ET se incluyeron las mismas muestras que en el análisis del impacto de la locación geográfica previo (ET1 y ET2), junto con otras 17 muestras más, provenientes de los mismos sets de datos, pero que no habían sido incluidas anteriormente ya que correspondían a edades diferentes (siendo la edad uno de los parámetros evaluados en el análisis anterior).

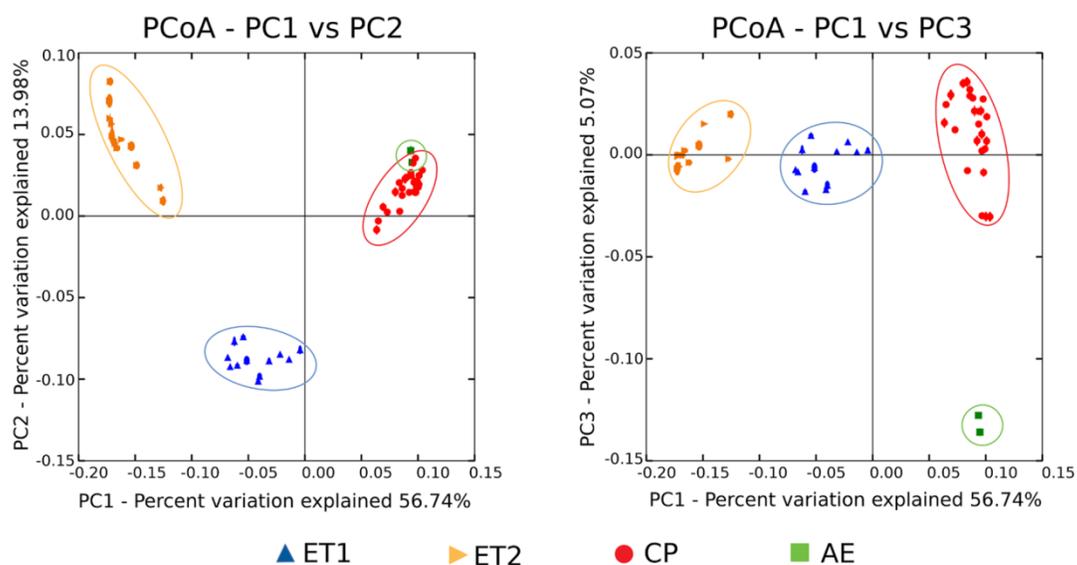
Por su parte, dentro del grupo de CF, se contó con 27 muestras provenientes de 9 granjas CP y 1 AE.

Un total de 3.032.606 secuencias fueron obtenidas y pasaron los umbrales mínimos de calidad establecidos, lográndose un promedio de secuencias por muestra de 49.168, 49.881, 69.817 y 49.297 para los grupos de ET1, ET2, CP y AE respectivamente.

La distribución de estos sets de datos experimentales (ET) y comerciales (CF) fue evaluada en un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac no ponderadas. La coordenada 1 (PC1) permitió observar claras diferencias entre los sets de datos experimentales y comerciales (ET vs CP y AE), mientras que el PC2 logró

diferenciar los ensayos experimentales entre sí (ET1 y ET2). Finalmente, el PC3 separó los datos de CF en función del tipo de granja comercial evaluado (AE y CP) (Figura 1.5).

Adicionalmente, los índices de alfa diversidad confirman la separación de estos dos grandes grupos (ET y CF), tanto en los índices de riqueza como en los de diversidad (Tabla 1.7).



**Figura 1.5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac no ponderadas de las muestras Argentinas.** Las muestras de la microbiota del contenido cecal de pollos de diferentes fuentes de Argentina fueron designadas como ET1: Ensayo 1, ET2: Ensayo 2, CP: Avicultura convencional y AE: Granja agroecológica.

**Tabla 1.7. Índices de alfa diversidad para las muestras de ciegos argentinos**

Muestra	OTUs por muestra	Índice de Chao1	Diversidad de Shannon	Diversidad de Simpson	Cobertura de Good
ET1	328,92±34,20 <sup>a</sup>	367,05±34,88 <sup>a</sup>	5,27±0,34 <sup>a</sup>	0,91±0,02 <sup>a</sup>	0,99±0,01
ET2	189,58±39,60 <sup>b</sup>	218,81±49,63 <sup>b</sup>	4,63±0,45 <sup>b</sup>	0,90±0,04 <sup>a</sup>	0,99±0,01
CP	571,04±37,11 <sup>c</sup>	623,73±43,90 <sup>c</sup>	6,56±0,29 <sup>c</sup>	0,97±0,01 <sup>b</sup>	0,99±0,01
AE	550,50±17,68 <sup>c</sup>	614,39±19,87 <sup>c</sup>	6,82±0,11 <sup>c</sup>	0,98±0,00 <sup>b</sup>	0,99±0,01

Se muestran la Media±Desvío Estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras de acuerdo al test de Kruskal Wallis con Mann-Whitney post-hoc test ( $p < 0,05$ ) y corrección de Bonferroni. ET1: Ensayo 1, ET2: Ensayo 2, CP: Avicultura convencional, AE: Granja agroecológica.

Al analizar la estructura de las comunidades bacterianas de estas muestras, se encontraron que los filos con mayor predominancia en los ciegos fueron Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria. Para las muestras de CF, las abundancias relativas fueron de 45,79%, 46,75% y 2,52% respectivamente para la cría convencional; mientras que los valores fueron 27,11%, 38,36% y 8,01% respectivamente para la granja agroecológica. Las bacterias que no pudieron clasificarse ascendieron al 15,71% en las muestras de AE y sólo fueron del 2% en CP.

Dentro del filo Firmicutes, Clostridia fue la clase dominante (41,20% para CP y 25,7% para AE), con predominancia del orden Clostridiales. En este orden, las familias predominantes fueron Ruminococcaceae y Lachnospiraceae en CP (18,22% y 5,43% respectivamente), y para AE se observaron tres familias con abundancias relativas similares: Ruminococcaceae (4,96%), Lachnospiraceae (4,35%) y Veillonelaceae (7,35%).

Dentro del filo Bacteroidetes, el orden Bacteroidales, de la clase Bacteroidea, mostró la mayor abundancia (46,75% para CP y 38,35% para AE). Las familias más

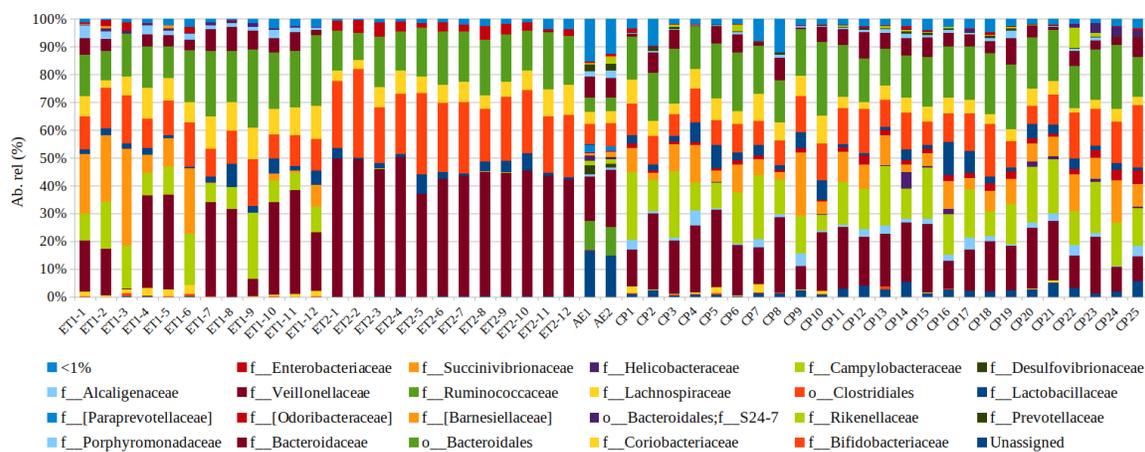
abundantes en este orden fueron Bacteroidaceae (18,56% y 18,28%), Rikenellaceae (15,47% y 1,46%) y Barnesiellaceae (8,39% y 1,27%).

Por su parte, las muestras de microbiota del TGI de aves provenientes de ET estuvieron dominadas por el filo Firmicutes (50,67%), seguido de Bacteroidetes (44,84%) y Proteobacteria (3,41%).

Dentro del filo Firmicutes, Clostridia fue la clase dominante (47,23%) con predominancia del orden Clostridiales. Las familias más abundantes fueron Ruminococcaceae y Lachnospiraceae (17,64% y 7,82% respectivamente).

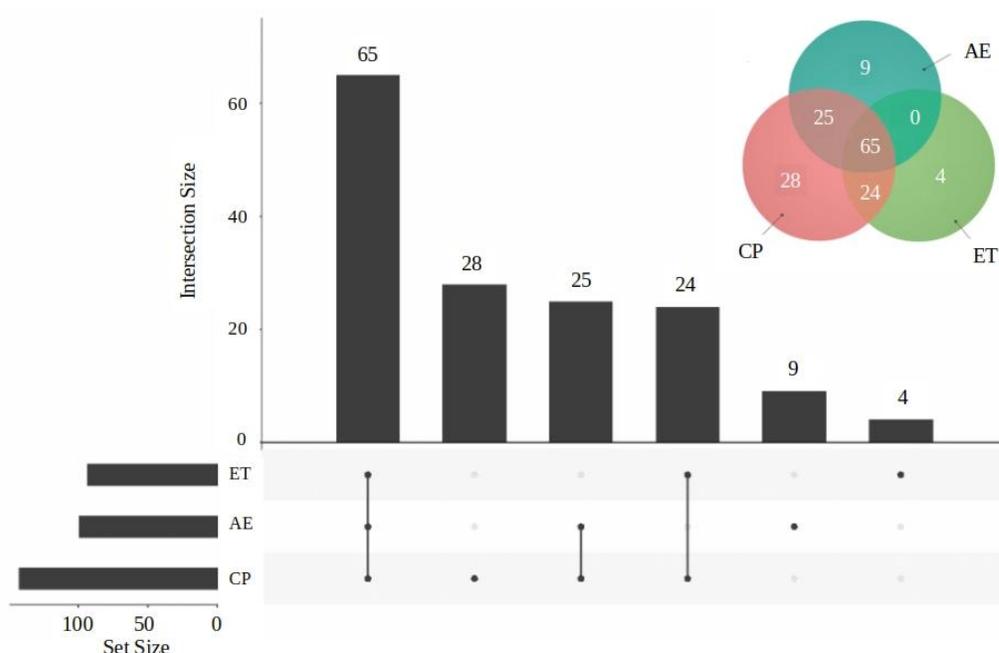
Dentro del filo Bacteroidetes, Bacteroidales fue el orden predominante de la clase Bacterioidea (44,84%), y en este caso las familias más abundantes fueron Bacteroidaceae (33,47%), Rikenellaceae (5,86%) y Barnesiellaceae (5,50%).

Todos estos datos pueden observarse en la Figura 1.6 y los análisis estadísticos de las diferentes abundancias relativas de los diferentes taxa pueden observarse en el Apéndice 1.7.



**Figura 1.6. Abundancia relativa de las bacterias clasificadas a nivel familia de muestras argentinas.** Las muestras de ciegos de aves de producción de Argentina fueron designadas como ET1: Ensayo experimental 1; ET2: Ensayo experimental 2; AE: Granja agroecológica y CP: Granja avicultura convencional. La clasificación taxonómica está expresada como: o\_orden y f\_familia.

A pesar de las diferencias observadas entre estas muestras, la microbiota de los pollos criados bajo condiciones comerciales (CP y AE) o experimentales (ET) mostraron un core taxonómico de 65 OTUs compartidas entre estas muestras (Figura 1.7), las cuales se asignaron taxonómicamente a 7 filos y 38 familias. 15 de ellas mostraron abundancias relativas de al menos 1% en alguna de las muestras, por lo que podían considerarse como mayormente abundantes. Estas OTUs compartidas estuvieron dominadas por el género *Bacteroides*, la familia Rikenellaceae, el orden Clostridiales y la familia Ruminococcaceae. Todas las diferencias entre las muestras, en las abundancias relativas entre estos taxa, pueden observarse en la Tabla 1.8.



**Figura 1.7. Gráfico de UpSet y diagrama de Venn para las muestras de Argentina.** El gráfico de UpSet y el diagrama de Venn muestran el número de OTUs compartidas entre las diferentes muestras de Argentina, designadas como ET: muestras experimentales, CP: avicultura convencional y AE: granja agroecológica.

**Tabla 1.8. Lista de OTUs compartidas entre las muestras de ciegos de Argentina.** La clasificación taxonómica de las OTUs compartidas con abundancias relativas mayores al 1% está expresada hasta el nivel de género.

Filo	Orden	Familia	Género	ET	AE	CP
Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	33,47	18,28	18,56
Bacteroidetes	Bacteroidales	Rikenellaceae	Unclassified	5,86	1,46	15,45
Bacteroidetes	Bacteroidales	[Barnesiellaceae]	Unclassified	5,50	1,27	8,39
Firmicutes	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	2,87	0,24	3,80
Firmicutes	Clostridiales	Unclassified	Unclassified	18,76	7,86	11,97
Firmicutes	Clostridiales	Lachnospiraceae	Unclassified	4,38	0,59	1,92
Firmicutes	Clostridiales	Lachnospiraceae	[Ruminococcus]	2,44	3,24	2,74
Firmicutes	Clostridiales	Ruminococcaceae	Unclassified	10,08	2,21	7,94
Firmicutes	Clostridiales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	0,36	0,77	3,60
Firmicutes	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Oscillospira</i>	2,62	1,63	4,23
Firmicutes	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	4,37	0,33	2,38
Firmicutes	Clostridiales	Veillonellaceae	<i>Megamonas</i>	0,01	1,17	1,92
Firmicutes	Clostridiales	Veillonellaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>	2,49	5,77	2,39
Proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Sutterella	0,97	2,34	0,64
Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Unclassified	1,91	0,84	0,31

ET: ensayos experimentales, CP: avicultura convencional, AE: granjas agroecológicas. Valores de abundancia relativa expresados como porcentajes (%).

## 4 Discusión

Así como en otros vertebrados, la composición de la microbiota del TGI de las aves está influenciada tanto por factores genéticos como no genéticos. El poder comprender la contribución de distintos factores en la determinación de la estructura de una comunidad microbiana, es un paso crítico para el desarrollo de estrategias de modulación que permitan mejorar la producción, en este caso, aviar. Algunos estudios mostraron que el efecto de los factores no genéticos en la modulación de la microbiota, es más importante que el producido por los factores genéticos (Shang *et al.*, 2018). En este sentido, nuestros resultados mostraron que la locación geográfica tiene un rol relevante en la modulación de la microbiota de pollos, al compararlo con los otros factores evaluados. Otros estudios

encontraron resultados similares, tanto en la modulación de la microbiota de humanos, como en aves (Videnska *et al.*, 2014; Yatsunenko *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2016).

Fallani *et al* (2010) encontraron la presencia de un gradiente geográfico que modula la microbiota de niños en Europa. En ese grupo etario, la abundancia de Bacteroidaceae, Enterobacteriaceae y Lactobacillaceae varió marcadamente en función de su locación geográfica, presentando abundancias relativas mayores en niños de los países del sur de Europa.

Nuestros resultados en pollos europeos muestran un patrón similar, maximizando las diferencias de las abundancias relativas en latitudes extremas. Las abundancias relativas de Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae fueron menores en muestras pertenecientes a países que se encuentran más al norte (Alemania) comparadas con las muestras de los países del sur europeo (Eslovenia, Croacia y Hungría). Así mismo, este gradiente geográfico fue opuesto cuando se evaluaron las abundancias del filo Bacteroidetes.

Un análisis de la influencia geográfica sobre la microbiota de buches de aves, confirmó que las mayores diferencias eran determinadas por el ambiente (Godoy-Vitorino *et al.*, 2012). En otro estudio, Hird *et al.* (2014) sugirieron que la genética podría tener un rol menos importante en la influencia de la microbiota del TGI de aves, en comparación con factores no genéticos, como la localidad, la edad o la dieta. Finalmente, en un estudio aviar más amplio, donde varias especies fueron evaluadas, Waite y Taylor (2014) atribuyeron la composición de la microbiota del TGI mayormente a la localidad.

En este tipo de meta-análisis, uno de los principales desafíos debido a la utilización de información proveniente de bases de datos públicas, es la consideración de sesgos y limitaciones de los enfoques metodológicos de cada uno de los sets de datos utilizados, que podrían generar resultados poco confiables luego de los análisis bioinformáticos. Por

ejemplo, la profundidad de secuenciación determinará indirectamente la abundancia de las especies bacterianas encontradas. De hecho, la detección de OTUs raras, es decir en baja proporción, requiere la presencia de una cantidad importante de secuencias por muestra (Weiss *et al.*, 2017). En este trabajo, esta restricción pudo superarse realizando una normalización de los datos a través de sub-muestreos aleatorios y utilizando el método TSS (total-sum scaling). Adicionalmente, en este trabajo se consideraron tres factores relacionados con los enfoques metodológicos (el kit de extracción de ADN utilizado, la región variable del gen ARNr 16S que fue secuenciada y la plataforma de secuenciación elegida) como variables importantes a considerar en el análisis.

A pesar de que Fouhy *et al.* (2016) encontraron que el método de extracción tenía un bajo efecto en la composición general de las comunidades microbianas, Kennedy *et al.* (2014) observaron diferencias estadísticamente significativas en las abundancias relativas asociadas a diferentes métodos de extracción de ADN. Walker *et al.* (2015) y Fouhy *et al.* (2016) encontraron que los primers o cebadores de PCR utilizados, son críticos en la determinación de los perfiles de bacterias secuenciadas. En el presente trabajo, para superar el sesgo potencial debido, tanto a las diferentes regiones variables del gen ARNr 16S analizadas como a los pares de cebadores específicos, utilizamos dos enfoques de análisis, entendiendo al enfoque “close reference” o “cerrado” como el más conservador en el agrupamiento de las OTUs, que permite comparar las muestras de los diferentes estudios a riesgo de descartar lecturas reales y novedosas. Finalmente, Allali *et al.* (2017) demostraron que existen diferencias significativas en la diversidad microbiana y en la riqueza de especies encontradas, en función de la plataforma de secuenciación y los protocolos de preparación de bibliotecas utilizados.

En nuestro trabajo, corroboramos –de acuerdo a los valores de R<sup>2</sup>- que la plataforma de secuenciación, kit de extracción de ADN y la región del gen ARN ribosomal 16S secuenciada (a partir de diferentes sets de primers utilizados), mostraron un impacto en la composición microbiana, aunque su efecto fue menor al producido por la influencia de la región geográfica. Reforzando este concepto, los dos sets de datos de Argentina mostraron un agrupamiento conjunto en el PCoA, a pesar de provenir de ensayos diferentes, realizados de forma aislada temporalmente y con diferencias procedimentales.

Otro análisis realizado fue el test de Mantel, una herramienta poderosa para analizar datos multivariados, particularmente cuando los datos se expresan como matrices de distancia. En este sentido, nuestros resultados mostraron una correlación significativa entre las matrices de distancia de beta diversidad (distancia UniFrac no ponderada) y las distancias geográficas del semiverseno (haversine), reforzando la mayor influencia de la geografía sobre otros factores que puedan surgir de las limitaciones metodológicas.

Otros factores evaluados, como la porción intestinal o la edad de los animales, parecieron no presentar un impacto significativo en la modulación de la microbiota al compararlos con el efecto producido por la locación geográfica. Por ejemplo, las muestras de Malasia se agrupan juntas a pesar de pertenecer a diferentes secciones del TGI (íleon y ciego) y a dos grupos etarios diferentes (21 y 42 días). Así mismo la dieta, uno de los factores más estudiados en la bibliografía por sus efectos moduladores, muestra una menor influencia que la geografía. En este sentido, los datos utilizados para algunos países incluyeron más de un tratamiento dietario y estas diferencias no se vieron reflejadas. Por ejemplo, el conjunto de datos de Alemania incluye dos tratamientos, uno alimentado con dieta comercial y otro con un aditivo dietario de fosfato monocálcico, y de igual manera

sucede en las muestras de Estados Unidos o Argentina, que incluyen dietas comerciales y otras con aditivos de ácidos orgánicos, taninos o antibióticos (Tabla 1.1).

Las diferencias observadas en la microbiota nos permitieron introducir la noción de “microbiota local” debido a la divergencia que observamos vinculada con la ubicación geográfica. En este sentido, reanudamos la perspectiva de la geografía desde el entorno humano, y proponemos que la microbiota local refleja una combinación de elementos no genéticos autóctonos que modulan la composición bacteriana. En otras palabras, proponemos que la ubicación geográfica es una característica convergente que combina factores no genéticos.

Vale la pena tener en cuenta esta microbiota local como la línea de base, adecuada tanto para identificar la correlación del estilo de vida de las aves de corral con la composición de la microbiota del TGI, para probar el efecto de aditivos en la dieta sobre la microbiota o para mejorar el rendimiento de la producción avícola. Por ejemplo, el análisis de la microbiota del TGI de aves de corral de Argentina nos permitió caracterizar una microbiota nativa, con una abundancia relativa de la familia Veillonellaceae más predominante (> 3%) que en cualquiera de los otros países analizados (menos del 1%). En particular, los miembros de esta familia son anaerobios obligados, Gram negativos y morfológicamente diversos, capaces de degradar ácidos orgánicos, fermentar lactato y formar co-agregados intergénicos con otras bacterias, proporcionando nutrientes y protección a todos los participantes (Gronow *et al.*, 2009).

Si bien podemos hablar de una microbiota local argentina, logramos distinguir la existencia de estructuras comunitarias específicas vinculadas a CF o ET a nivel sub-local. Los índices de diversidad mostraron diferencias entre estos dos grandes grupos de

muestras, pudiendo observarse que las muestras de CF poseían valores más altos que las de ET (OTUs observadas, índices Chao1, Shannon y Simpson - Tabla 1.7).

Consideramos que el manejo de la cama de pollo es una de las variables más importantes que podrían ser responsables de las diferencias observadas entre ambos grupos de muestras. La cama de pollo es una mezcla de virutas de madera, cáscara de arroz, girasol o maní que se ubica sobre el suelo de los galpones, cumpliendo la función de aislar a los animales del frío, protegerlos de golpes (amortiguación) y fundamentalmente absorber la humedad de las deyecciones (Irisarri, 2013). A lo largo del ciclo de cría, la cama se modifica por la acumulación de las excretas, restos de alimento y plumas de los animales, aumentando su humedad, compactándose y disminuyendo su funcionalidad.

A diferencia de lo que sucede en los ambientes experimentales (ET), donde al inicio de cada ensayo se utiliza una cama de pollo nueva, en las granjas comerciales la cama de pollo es reutilizada durante varios ciclos productivos. Al final de cada ciclo de crecimiento se quita la capa superficial (descostrado) y se repone con material nuevo, o pueden romperse las zonas apelmazadas y mezclarse con capas inferiores; pero sólo se realiza un recambio de la cama en forma completa una vez por año. Es decir, la misma cama es reutilizada por cinco o seis ciclos productivos consecutivos, modificándose su composición bacteriana y fisicoquímica a lo largo del tiempo.

Otros autores han demostrado el efecto de la cama en la composición y estructura de las comunidades microbianas del TGI de aves de corral, ya que los pollitos que ingresan a los galpones con 1 día de vida, picotean la cama inoculando su TGI con las bacterias allí presentes. En ese sentido, nuestros resultados están de acuerdo con Wang *et al.* (2016) y Cressman *et al.* (2010), quienes dicen que la diversidad microbiana de muestras cecales de

animales criados en corrales con cama reutilizada fue significativamente mayor en comparación con la diversidad de aquellos criados con cama nueva.

Estas diferencias se observaron claramente en el análisis de escalamiento multidimensional. La Figura 1.5 muestra no sólo la división en las condiciones experimentales o comerciales (ET y CF) sino también las subdivisiones dentro de cada grupo. ET comprende a dos diseños experimentales ligeramente diferentes (ET1 y ET2) y CF involucra dos sistemas alternativos de manejo productivo (CP y AE). Notablemente, aunque dentro de CP encontramos muestras de diferentes granjas comerciales, todas ellas se encuentran agrupadas, significativamente separadas de las AE.

A pesar de estas diferencias encontradas en las muestras argentinas, describimos un core taxonómico microbiano. La identificación de un núcleo taxonómico entre las aves de corral argentinas podría ser útil para evaluar la dinámica de la microbiota de una manera más precisa a nivel regional. Las cuatro OTUs compartidas más abundantes fueron g\_Bacteroides, f\_Rikenellaceae, o\_Clostridiales y f\_Ruminococcaceae, siendo estos miembros típicos del TGI de pollos.

El ciego alberga una comunidad bacteriana que permite la fermentación anaeróbica de celulosa y otros sustratos (Díaz Carrasco *et al.*, 2018). Muchos de los miembros de esta comunidad pertenecen al filo Bacteroidetes. Entre los Bacteroidetes, *Bacteroides* fue el género más abundante en el core argentino. Este género es capaz de realizar una degradación eficiente de polisacáridos y producir ácidos grasos volátiles de cadena corta (Saxena *et al.*, 2016).

La familia Rikenellaceae, por su parte, suele utilizarse como un indicador de buena salud gastrointestinal. Los miembros de esta familia parecen estar especializados en el

tracto digestivo de varios animales diferentes y han sido identificados tanto en muestras fecales como del TGI (Graf, 2014).

Dentro del filo Firmicutes, la clase Clostridia es conocida por dominar la microbiota del íleon y ciego de pollos sanos (Mohd Shaufi *et al.*, 2015). Rinttilä y Apajalahti (2013) sugieren que la mayoría de los miembros de la clase Clostridia no son patógenos, abarcando muchas bacterias benéficas con capacidad de degradar celulosa y almidón. De acuerdo con nuestros resultados, en el core de muestras argentinas, el orden Clostridiales fue el más abundante del filo Firmicutes. Perteneciente a la clase Clostridia, las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae fueron las más abundantes, resultados similares a los descritos por Oakley *et al.* (2014) y Neumann y Suen (2015) para los ciegos de pollo de engorde.

## **5 Conclusión**

Los resultados del presente estudio lograron reforzar el papel de la locación geográfica como un factor modulador de la comunidad microbiana presente en el tracto gastrointestinal de pollo.

A pesar de las limitaciones inherentes a este tipo de meta-análisis, principalmente debido a posibles sesgos metodológicos, los resultados permiten observar una imagen global de la diversidad. Aquí se presentó un análisis realizado con un enfoque conservador, donde se utilizaron para el armado de las OTUs diferentes métodos tanto de referencia cerrada como abierta, debido a las diferentes regiones del gen ARNr 16S involucradas. El enfoque cerrado permite limitar la posibilidad de que el ruido de la secuenciación interfiera

con los resultados, a costa de quizás descartar lecturas reales y novedosas, y aun utilizando este enfoque se obtuvieron resultados similares. Igualmente, deberían incluirse un mayor número de sets de datos en análisis futuros, para validar los resultados aquí obtenidos y lograr respaldar las similitudes encontradas en la composición de las comunidades de cada uno de los países evaluados (o al menos, en países de latitudes similares).

Por otro lado, este estudio es el primero que describe la microbiota local argentina, tanto para granjas experimentales como comerciales. Esta información podría ser de utilidad al considerarse como la primera aproximación de referencia al momento de probar aditivos dietarios moduladores de la microbiota del TGI en contextos específicos, ya sea para mejorar la salud de los animales o la producción avícola en general. Sin embargo, se requieren más investigaciones para lograr una mejor vinculación de las condiciones ambientales con parámetros de modulación de la microbiota y lograr desarrollar estrategias novedosas para mejorar los rendimientos.

## Capítulo 2

# Los promotores de crecimiento como factores de modulación del ambiente productivo

*Croyez ceux qui cherchent la vérité, doutez de ceux qui la trouvent*

André Gide

1869-1951, Francia

## 1 Introducción

### 1.1 Microbiota intestinal y producción aviar.

La utilización del estudio de la microbiota en la producción aviar ha ganado terreno en los últimos años, sobre todo dadas las nuevas tendencias alimenticias y la conciencia ambiental creciente a nivel global, que comienzan a demandar producciones con menos impacto y más saludables. Estas nuevas exigencias de los mercados trae consigo la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías y prácticas de manejo para poder mantener los niveles productivos y cumplir con dichas demandas de sustentabilidad de la actividad.

Uno de los principales cuestionamientos globales a la producción animal es la utilización de antimicrobianos como promotores de crecimiento. Los primeros registros de antibióticos utilizados en producción aviar se remontan a la década de 1940 (Moore *et al.*, 1946; Yang *et al.*, 2019) y los mismos continuaron siendo administrados en dosis sub-terapéuticas por más de 80 años, con el objetivo de mejorar la conversión alimenticia y aumentar la ganancia de peso de los animales (Frost y Woolcock, 1991).

Si bien la forma en que éstos promueven el crecimiento no está del todo comprobada, el mecanismo más aceptado es el de la modulación de la microbiota intestinal, produciendo modificaciones en las abundancias relativas de determinados grupos bacterianos que tienen efectos beneficiosos para el hospedador (Allen *et al.*, 2013). De esta manera, aumentaría la disponibilidad de nutrientes y energía, y disminuiría la concentración de moléculas tóxicas, como el amoníaco o aminos en el intestino, lo que podría explicar el efecto global de promoción del crecimiento (Corpet, 2000).

El establecimiento de la microbiota intestinal de las aves comienza con la incorporación de bacterias del medio ambiente que colonizan el tracto digestivo, volviendo

a la comunidad microbiana más compleja a medida que el animal crece (Van Der Wielen *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2013).

En los ambientes productivos juega un rol determinante la utilización de la cama de pollo, que se ubica sobre el suelo de los galpones, cumpliendo como se dijo anteriormente, la función de aislar a los animales del frío, protegerlos de golpes y absorber la humedad de las deyecciones (Irisarri, 2013). Los ciclos productivos tienen una duración que no excede los 45 días desde que los pollitos ingresan al galpón hasta que culmina su crecimiento, lográndose a lo largo de un año un total de entre cinco y seis ciclos productivos. A lo largo del ciclo, la cama se modifica por la acumulación de las excretas, restos de alimento y plumas de los animales, aumentando su humedad, compactándose y disminuyendo su funcionalidad. Al final de cada ciclo, se quita la capa superficial (descostrado) y se repone con material nuevo, o pueden romperse las zonas apelmazadas mezclándose con las capas inferiores; pero sólo se cambia en forma completa una vez por año.

Algunos estudios mostraron que la cama de pollo podría modular la comunidad microbiana del intestino de las aves de corral, afectando su estructura y composición (Torok *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). Las bacterias intestinales provenientes de las excretas funcionarían como inóculo primario de la cama y la cama favorecería la colonización del tracto gastrointestinal de los nuevos pollitos que ingresan al galpón para comenzar el siguiente ciclo (Cressman *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

Nurmi y Rantala (1973) mostraron que la inoculación oral de pollitos con microbiota de pollos adultos sanos, disminuía la infección de los mismos frente a *Salmonella* debido al principio de exclusión competitiva (EC). A partir de este descubrimiento fueron muchos los trabajos realizados sobre la posibilidad de utilizar la EC para el control de infecciones, no sólo de *Salmonella* (Lloyd *et al.*, 1977; Pivnick y Nurmi,

1982; Stern *et al.*, 2001) sino también de otros patógenos como *Campylobacter jejuni* (Hakkinen y Schneitz, 1999; Stern *et al.*, 2001) y *Escherichia coli* (Hakkinen y Schneitz, 1996; Stavric *et al.*, 1992). Además, se ha visto que la EC disminuye la mortandad por enteritis necrótica y reduce los niveles de *Clostridium perfringens*, su principal agente causal (Craven *et al.*, 1999; Kaldhusdal *et al.*, 2001). La obtención de una microbiota saludable, a través de la EC, puede disminuir la prevalencia de estas bacterias patógenas y el riesgo asociado al desarrollo de enfermedades (Wang *et al.*, 2016).

En resumen, una de las funciones más importante que cumple la microbiota del tracto gastrointestinal es evitar la colonización de microorganismos invasores, entendiendo este ambiente como una comunidad compleja con una gran variedad de interacciones entre las bacterias y el hospedador (Rolfe, 1991).

En los últimos años, el uso de antimicrobianos en medicina veterinaria está siendo fuertemente cuestionado y restringido, debido a la recurrente emergencia de cepas bacterianas resistentes que podrían transferirse a humanos a través de residuos en los productos alimenticios derivados de animales (Catry *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2014; de Jong *et al.*, 2012; Nosanchuk *et al.*, 2014). El uso no terapéutico de antimicrobianos también se ha vinculado a la propagación de resistencias múltiples, incluyendo resistencia cruzada contra drogas que nunca fueron utilizadas en agricultura (Marshall y Levy, 2011).

Debido a esta problemática, los países miembros de la Unión Europea prohibieron en 2006 el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales de producción y la U. S. Food and Drug Administration (FDA) anunció medidas similares en EE.UU. en 2013. Además, la Unión Europea refuerza esta decisión con una nueva legislación que regirá a partir de 2022, donde prohíbe la utilización de antimicrobianos con uso profiláctico

o de promoción del crecimiento, agregando una cláusula de reciprocidad para los países a los que les compra productos cárnicos.

Por estos motivos, el uso de promotores de crecimiento alternativos, que reemplacen a los antibióticos tradicionalmente utilizados, es fundamental para lograr el control de las enfermedades animales (Allen *et al.*, 2013), mantener los niveles de producción sin poner en peligro la salud pública (Seal *et al.*, 2013) y, además, para ampliar las posibilidades de exportación de productos de origen animal desde nuestro país hacia el mundo. Es aquí donde la secuenciación masiva de amplicones tomó un rol fundamental para evaluar los cambios que sufrían las comunidades microbianas frente al uso de aditivos en la dieta.

## **1.2 Alternativas al uso de antibióticos**

Existe una gran variedad de aditivos dietarios alternativos a los antibióticos, con presumible efecto antimicrobiano y/o de promoción del crecimiento, que pueden utilizarse durante el ciclo de crecimiento de las aves (Cheng *et al.*, 2014; Seal *et al.*, 2013). Entre ellos encontramos a los prebióticos (ingredientes no digeribles con efecto selectivo sobre la microbiota intestinal) (Pourabedin *et al.*, 2015), probióticos (bacterias benéficas como *Lactobacillus* o *Bifidobacteria*), ácidos orgánicos (que eliminan aquellas bacterias que son sensibles a pH ácidos, además de modificar el ambiente intestinal generando condiciones menos favorables para ciertas bacterias patógenas) (Dibner y Buttin, 2002; Nava *et al.*, 2009; Verstegen y Williams, 2002) y extractos de plantas (que proveen propiedades benéficas derivadas de sus metabolitos secundarios tales como terpenoides, flavonoides, taninos y alcaloides) (Huyghebaert *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2008).

Los taninos son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde cumplen un rol protector (Díaz Carrasco *et al.*, 2018). La adición de taninos en la dieta de animales de granja comenzó a utilizarse para mejorar la nutrición y controlar las enfermedades entéricas (Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, los efectos de los taninos en la modulación de la microbiota intestinal de pollos no están aún claros, ya que los estudios previamente realizados se basaron en observaciones *in vitro* o en métodos dependientes de cultivo, que no proporcionan una descripción precisa de la composición y estructura de la comunidad microbiana del TGI de las aves.

### 1.3 Hipótesis

El uso de taninos como aditivo alternativo al uso de antibióticos, promueve de manera similar el crecimiento de las aves, por lo que producirá cambios semejantes en la composición de la microbiota intestinal.

La modulación de los aditivos sobre la microbiota cecal, se verá reflejada en la microbiota presente en la cama de pollo.

Para poner a prueba esta hipótesis, analizamos muestras de ensayos experimentales y de granjas comerciales, evaluando tanto ciegos como camas, al adicionar en la dieta dosis subterapéuticas de antibióticos o aditivos alternativos para evaluar sus diferencias con el objetivo de:

- Caracterizar la microbiota intestinal en respuesta al uso de taninos como promotor de crecimiento, en ambientes experimentales y comerciales;
- Caracterizar la microbiota presente en la cama de pollo de ambientes productivos, consecuencia de la adición de taninos o antibióticos en la dieta.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Ensayo 1: Ensayo bajo condiciones controladas.

Un total de 120 pollitos de la línea Cobb de 1 día de vida, que no habían sido vacunados, fueron obtenidos para realizar un ensayo de 30 días de duración en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Científicas Veterinarias y Agronómicas (CICVyA-INTA).

Estos pollitos fueron divididos aleatoriamente en tres grupos (40 pollitos por grupo) que correspondieron a los tres tratamientos dietarios evaluados: 1) CON: grupo control, al cual no se le agregaron aditivos en la dieta; 2) BAC: dieta suplementada con una dosis sub-terapéutica de bacitracina de zinc (1 g/Kg de alimento); 3) TAN: dieta suplementada con una mezcla de taninos de castaño (*Castaneda sativa*) y quebracho (*Schinopsis lorentzii*) (1 g/Kg de alimento). El alimento base utilizado fue una mezcla inicial comercial (3200 Kcal/Kg; 20% proteína) a la cual se le adicionó el suplemento correspondiente por tratamiento.

Se separaron los tres grupos en corrales provistos con comederos y bebederos que permitieron a las aves tener alimento y bebida *ad libitum*.

Se controlaron las condiciones ambientales con un sistema de ventilación automatizada que permitió manejar la temperatura para tener 32°C el día 1, e ir disminuyéndola gradualmente hasta llegar y mantenerse en 24°C a partir del día 15. Se contó, además, con un ciclo de iluminación de 18 horas y se colocó sobre el piso de los corrales, cama de pollo fresca compuesta de virutas de madera comerciales.

En los días 12 (T1), 19 (T2), 26 (T3) y 30 (T4), se registró el peso de cada animal y la cantidad de alimento consumido por cada grupo. A partir de estos datos, se calculó el

índice de conversión alimenticia (FCR), como la relación entre el consumo de alimento (Kg) y el peso ganado (Kg) para cada grupo.

Este ensayo, que involucró el uso de animales, fue evaluado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del CICVyA-INTA Castelar antes de su ejecución.

### **2.1.1 Muestras de microbiota cecal del Ensayo 1**

Los días 12 (T1), 19 (T2), 26 (T3) y 30 (T4), cinco animales de cada grupo sufrieron eutanasia por dislocación cervical y se tomó el contenido de ambos ciegos de cada ave, obteniéndose un total de 12 muestras. Inmediatamente las muestras fueron refrigeradas en hielo para luego ser guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de ADN.

### **2.2 Ensayo 2: Ensayo en Granja Comercial**

Para la realización de este ensayo se contó con la colaboración de una granja comercial ubicada en la localidad de San Andrés de Giles, Buenos Aires, la cual brindó tanto sus instalaciones como el manejo de los animales a cargo de su personal durante el ciclo de cría de las aves.

En uno de sus galpones de producción se armaron 9 corrales, donde se mantuvieron 90 aves (10 aves por corral) creciendo bajo las mismas condiciones de manejo que el resto de las aves del galpón de la granja, con el objetivo de simular el ambiente productivo (Figura 2.1).



**Figura 2.1. Ensayo en granja comercial.** Distribución de los nueve corrales (tres corrales/tratamiento) ubicados en el galpón comercial.

Al igual que en el ensayo experimental, las aves tuvieron acceso *ad libitum* a la alimentación y bebida, y los pollitos ingresaron al galpón luego de que se había acondicionado la cama de pollo.

Se replicaron los 3 tratamientos (3 corrales/tratamiento) realizados anteriormente, respetando las dosis aplicadas: 1) CON: alimento sin aditivos; 2) BAC: alimento con una dosis sub-terapéutica de bacitracina de zinc (1 g/Kg de alimento); y 3) TAN: alimento con una dosis de una mezcla de taninos de castaño y quebracho (1 g/Kg de alimento).

### **2.2.1 Muestras de microbiota cecal del Ensayo 2**

A los 21 días de vida, se realizaron muestreos tomando 5 animales por corral para realizar pools de los contenidos de ambos ciegos de las aves, obteniéndose 9 muestras finales (3 muestras/tratamiento). Previo a la eutanasia de los mismos, se registraron los pesos individuales de cada ave.

Las muestras fueron inmediatamente refrigeradas en hielo para luego ser guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de ADN.

### **2.2.2 Muestras de microbiota de cama de pollo del Ensayo 2**

A los 21 días de vida de los animales, cuando se tomaron las muestras de contenido cecal, se realizaron muestreos de las camas de pollo de los corrales. Para ello, cinco submuestras de cada corral se tomaron de los primeros 10 cm de profundidad, con la intención de lograr captar la heterogeneidad espacial, y fueron homogeneizadas formando una única muestra obteniéndose, finalmente, 9 muestras de cama de pollo (3 muestras/tratamiento). Las mismas fueron transportadas refrigeradas hasta el laboratorio donde se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de ADN.

## **2.3 Ensayo 3: Muestreo de camas de pollo de granjas comerciales**

Además de las muestras de cama de pollo tomadas del ensayo realizado en un galpón comercial, se realizó un muestreo de camas de diferentes granjas comerciales. Un total de 46 muestras de cama de pollo fueron tomadas de 3 granjas comerciales, 25 de las mismas provinieron de galpones que utilizaban usualmente aditivos dietarios antibióticos (ATB) y 21 de galpones que utilizaban taninos (TAN). No se lograron conseguir muestras del

tratamiento control, es decir muestras sin aditivos dietarios, ya que los productores no estuvieron dispuestos a correr el riesgo de pérdidas económicas al no suplementar a las aves. Por este motivo, se contó únicamente con galpones suplementados con dosis subterapéuticas de antibióticos (el tratamiento habitual que las granjas utilizaban) o con la dosis recomendada de taninos (aplicados en galpones destinados a tal fin, donde nunca se habían utilizado antibióticos como promotores de crecimiento).

Estas muestras de cama de pollo se tomaron de galpones que contaban, al menos, con dos ciclos de cría consecutivos con suplementación de polifenoles o antibióticos respectivamente, a los 21 días del ciclo de vida de los animales según se muestra en la Tabla 2.1.

Cada una de las muestras estuvo formada por cinco sub-muestras que fueron tomadas de los primeros 10 cm de profundidad de la cama de los galpones. Todas las muestras fueron transportadas refrigeradas hasta el laboratorio donde se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de ADN.

## **2.4 Extracción de ADN y secuenciación**

Para todas las muestras de ciegos, ya sea provenientes del ensayo experimental-INTA o de granjas comerciales, el ADN genómico fue extraído a partir de 300 mg de la mezcla de contenidos cecales de cinco animales.

Para las muestras de cama de pollo se pesaron 5 g de cama por muestra en un tubo Falcon de 50 mL al que se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril y se vortexeó la mezcla durante 10 min. El material sobrenadante fue recuperado y se utilizaron 300  $\mu\text{L}$  para la extracción de ADN.

**Tabla 2.1. Datos de muestreo de camas de pollo de galpones comerciales.**

Muestras	Productor	Tratamiento	Muestras	Productor	Tratamiento
Z25	2	ATB	S06	2	TAN
Z26	2	TAN	S09	2	TAN
Z27	2	ATB	S17	1	ATB
Z28	2	TAN	S19	1	ATB
Z29	2	ATB	S21	3	TAN
Z30	2	TAN	S23	3	TAN
Z31	3	ATB	S25	3	TAN
Z34	3	ATB	S27	3	TAN
Z35	3	ATB	S29	2	ATB
Z36	3	ATB	S31	2	TAN
Z37	3	ATB	S43	2	ATB
Z38	3	ATB	S45	2	TAN
Z39	3	ATB	S47	2	ATB
Z40	3	ATB	S49	2	TAN
Z41	3	ATB	S51	2	TAN
Z42	2	ATB	S53	2	TAN
Z43	2	TAN	S55	2	TAN
Z45	3	ATB	S57	2	ATB
Z46	3	ATB	S59	2	TAN
Z47	3	ATB	S65	2	ATB
Z48	3	ATB	S67	2	TAN
S02	2	ATB	S79	2	TAN
S04	2	TAN	S81	2	TAN

ATB: aditivos antibióticos; TAN: aditivos en base a taninos.

Todas las muestras fueron extraídas utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La concentración de ADN y su pureza fue evaluada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) y luego fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

La región V3-V4 del gen ARN ribosomal 16S fue amplificada a partir del extracto de ADN obtenido. Tanto la construcción de las bibliotecas como la secuenciación fue realizada en Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) usando la plataforma MiSeq de Illumina. Las lecturas paired-end generadas de 300 pb fueron obtenidas utilizando los cebadores universales b341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y Bakt805R (5'-GACTACHVGGGT ATCTAATCC-3').

## 2.5 Análisis de la Comunidad Microbiana

Todas las lecturas (del ensayo experimental-INTA o de granjas comerciales) fueron analizadas con el programa QIIME 2 (versión 2019.10). El control de calidad y corrección de errores fue realizado con el algoritmo Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) (Callahan *et al.*, 2016). Este algoritmo utiliza un modelo paramétrico para inferir, de las lecturas totales, aquellas que corresponden a secuencias biológicas verdaderas, permitiendo la remoción de quimeras y de secuencias de baja calidad. Las lecturas fueron luego de-replicadas y se infirieron las variantes de las secuencias de amplicones (ASVs por sus siglas en inglés).

Las secuencias representativas de estas ASVs se clasificaron usando un clasificador *naive* Bayes previamente entrenado con la región V3-V4 de la base de datos SILVA con 99% de similitud en su versión 128.

Para evaluar si existieron diferencias estadísticamente significativas en las abundancias relativas de los taxa entre los tratamientos, se realizó un ANálisis de COMposición de Microbiomas (ANCOM) a diferentes niveles taxonómicos (Mandal *et al.*, 2015). La significancia fue expresada a través de la distribución empírica de W para el

análisis de los diferentes grupos y el resultado fue graficado en un diagrama de volcán. Adicionalmente, se complementó este análisis realizando un análisis de varianza -ANOVA- con corrección de Bonferroni utilizando el programa Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) (Parks *et al.*, 2014).

Las secuencias representativas de las ASVs fueron alineadas utilizando mafft (Kato *et al.*, 2002) y se realizó un árbol filogenético mediante fasttree (Price *et al.*, 2010).

Se estimaron parámetros de alfa y beta diversidad (ASVs observadas, Faith PD, índice de diversidad de Shannon y equitatividad de Pielou para alfa; y Unifrac ponderado y no ponderado (Lozupone y Knight, 2005) para beta) luego de que las muestras sufrieron una rarefacción a la máxima profundidad para la cual todas las muestras se veían representadas.

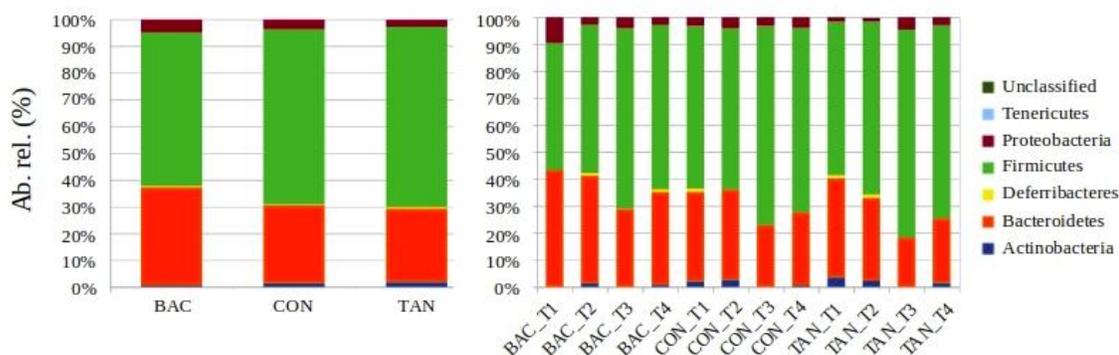
Los análisis estadísticos para alfa diversidad y las matrices de distancia de los parámetros de beta diversidad fueron realizados en QIIME2. Se graficaron los índices de diversidad alfa en boxplots y se utilizaron análisis de Kruskal–Wallis para estimar la diferencia entre todos los grupos, de a pares.

Por su parte, se graficaron los resultados de los análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de las matrices de distancia de los índices de diversidad beta para buscar diferencias entre grupos. Para ello se realizaron análisis permutacionales multivariados de varianza (PERMANOVA), con 999 permutaciones.

### 3 Resultados

#### 3.1 Ensayo 1: Ensayo bajo condiciones controladas.

A nivel filo, la microbiota cecal fue dominada por Firmicutes (CON: 65,52%, BAC: 57,49% y TAN: 67,4%) y Bacteroidetes (CON: 29,18%, BAC: 36,66% y TAN: 27,51%), seguidos por Proteobacteria (CON: 3,7%, BAC: 4,85% y TAN: 2,69%) y muy bajos niveles de Actinobacteria (CON: 1,29%, BAC: 0,49% y TAN: 1,75%). Existieron además, dos filos que mostraron valores menores al 1%: Deferribacteres (CON: 0,31%, BAC: 0,5% y TAN: 0,58%) y Tenericutes (sólo presente en el grupo TAN: 0,07%) que fueron encontrados sólo en determinadas muestras (Figura 2.2).

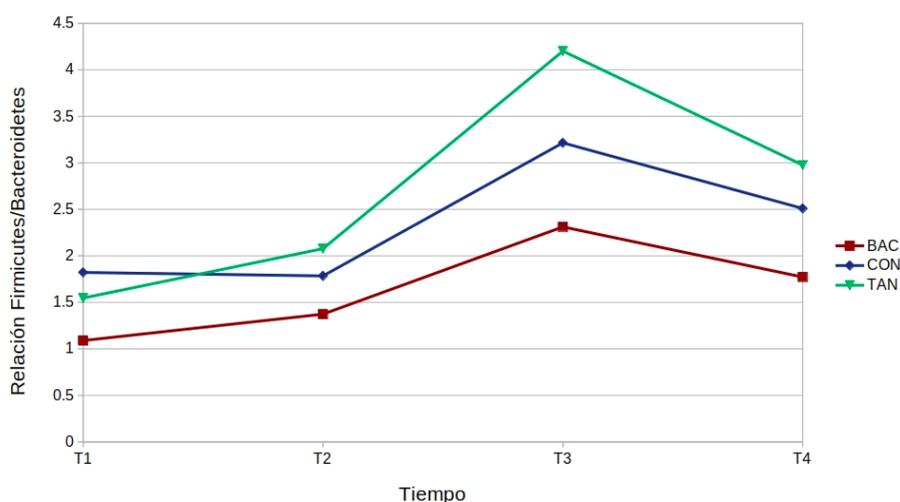


**Figura 2.2. Gráficos de composición de las comunidades microbianas a nivel filo de ciegos del ensayo 1.** BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos. T1: 12 días, T2: 19 días, T3: 26 días, T4: 30 días.

La relación Firmicutes/Bacteroidetes mostró variaciones a lo largo del tiempo para todos los tratamientos (Figura 2.3). A lo largo del ensayo, los Firmicutes fueron significativamente más abundantes en los tratamientos CON y TAN respecto al tratamiento

BAC; mientras que los Bacteroidetes mostraron un patrón contrario, con valores superiores para el grupo BAC.

Al inicio del ensayo (día 12 - T1) se observaron valores superiores de Firmicutes para el grupo CON respecto del grupo TAN y dicha relación se modifica a partir de los 19 días (T2) y hasta fin del ensayo.



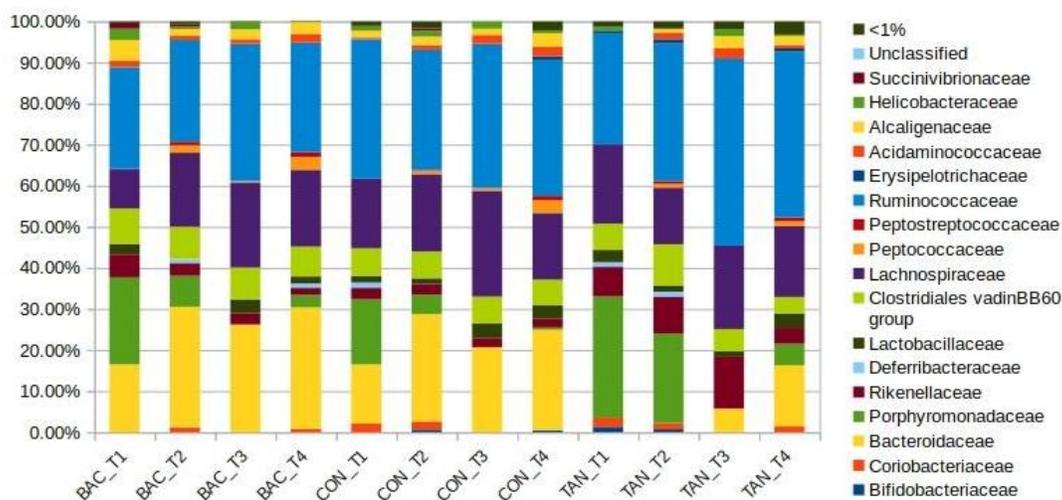
**Figura 2.3. Relación Firmicutes/Bacteroidetes a lo largo del tiempo para los tres tratamientos evaluados en ciegos de animales del ensayo 1.** BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos. T1: 12 días, T2: 19 días, T3: 26 días, T4: 30 días.

Diferentes grupos bacterianos fueron afectados por la adición de taninos o bacitracina a la dieta a lo largo del ciclo de cría de los animales. La disminución del género *Bacteroides* en el grupo tratado con TAN fue compensada por un incremento en la familia Rickenellaceae perteneciente al filo Bacteroidetes. Además, se observa un incremento en la familia Ruminococcace, perteneciente al filo Firmicutes, a los días 26 (T3) y 30 (T4).

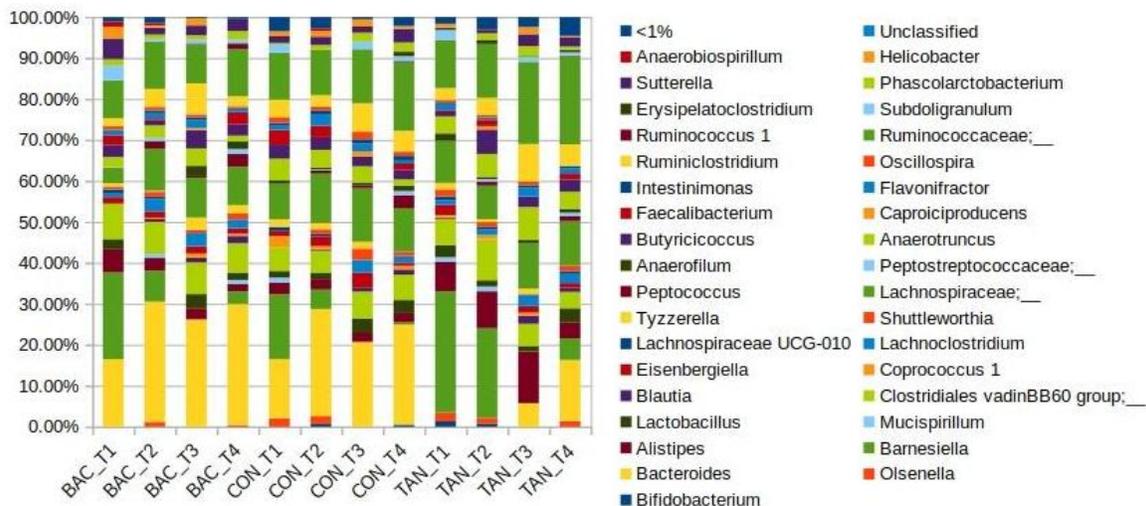
Una de las principales diferencias que se observó en el tratamiento con BAC fue que no se produjo una disminución significativa del género *Bacteroides* respecto del CON,

como sí sucede con los TAN, e incluso, al final del tratamiento produjo un aumento del 5% respecto del grupo control.

A los 12 días (T1), el tratamiento BAC impactó en un grupo de bacterias que incluyó el género *Mucispirillum* (perteneciente al filo Deferribacteres), la familia Ruminococcaceae (perteneciente al filo Firmicutes) y los géneros *Bifidobacterium* y *Olsenella* (pertenecientes al filo Actinobacteria). El género *Ruminococcus* mostró, además, una disminución constante a lo largo de todo el ensayo, comparado con los valores de abundancias relativas que mostró el grupo TAN (Figura 2.4 y 2.5).

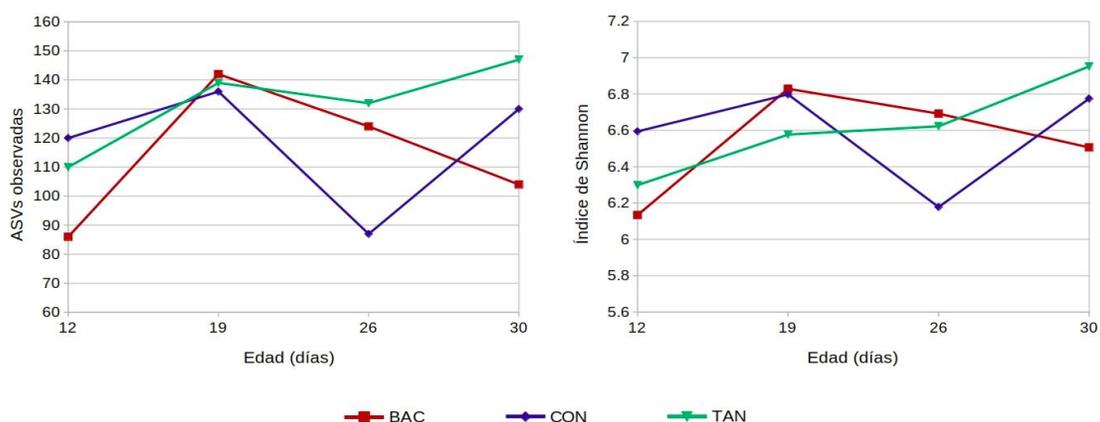


**Figura 2.4. Gráficos de composición de las comunidades microbianas a nivel familia de ciegos de animales del ensayo 1.** BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos. T1: 12 días, T2: 19 días, T3: 26 días, T4: 30 días.



**Figura 2.5.** Gráficos de composición de las comunidades microbianas a nivel género de ciegos de animales del ensayo 1. BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos. T1: 12 días, T2: 19 días, T3: 26 días, T4: 30 días.

La diversidad de las muestras (alfa diversidad) fue evaluada a través del número de ASVs observadas, Faith PD, índice de diversidad de Shannon y equitatividad de Pielou (Tabla 2.2 y Figura 2.6). En el Apéndice 2.1 se observan las curvas de rarefacción de las ASVs observadas e índice de Shannon. Las mismas permiten visualizar que todas las muestras llegaron al plateau, determinando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la diversidad bacteriana presente en las muestras de contenido cecal.



**Figura 2.6.** Índice de alfa diversidad (ASVs observadas e índice de Shannon), obtenidos de ciegos de animales del ensayo 1. Cada curva representa un tratamiento evaluado a lo largo del ciclo. BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos.

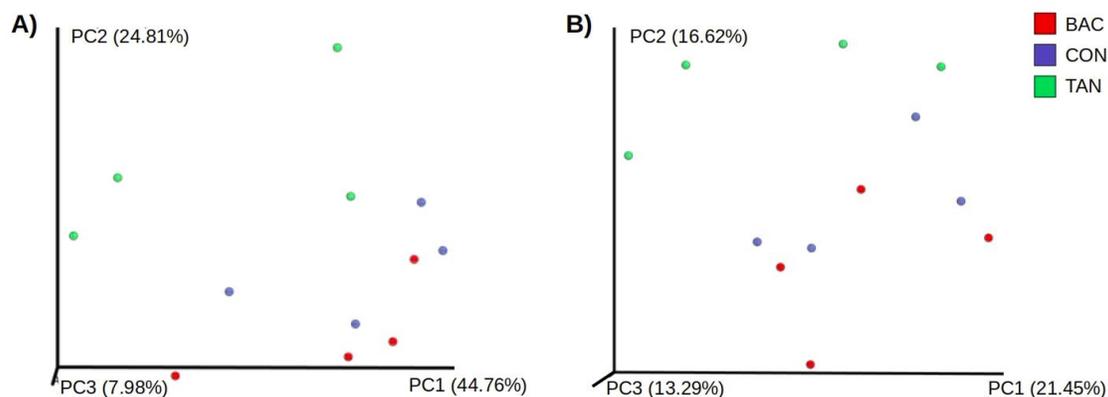
**Tabla 2.2.** Índice de diversidad alfa para las muestras correspondientes a los tres tratamientos y los cuatro tiempos de muestreo evaluados en el ensayo 1.

Muestra	ASVs Observadas	Faith PD	Índice de Shannon	Equitatividad de Pielou
CON T1	120	7,31	6,59	0,96
CON T2	136	7,95	6,80	0,96
CON T3	87	5,82	6,18	0,96
CON T4	130	7,79	6,77	0,96
BAC T1	86	5,77	6,13	0,95
BAC T2	142	8,19	6,83	0,96
BAC T3	124	6,34	6,69	0,96
BAC T4	104	7,00	6,51	0,97
TAN T1	110	7,03	6,30	0,93
TAN T2	139	8,86	6,58	0,92
TAN T3	132	7,27	6,62	0,94
TAN T4	147	8,93	6,95	0,97

BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos. T1: 12 días, T2: 19 días, T3: 26 días, T4: 30 días.

Los estimadores de diversidad alfa mostraron variación a lo largo del tiempo para todos los tratamientos. Al inicio del ensayo pudo observarse una disminución tanto en el número de ASVs como en el índice de Shannon para los tratamientos de BAC y TAN, comparados con el grupo CON. Los animales tratados con TAN lograron revertir esta situación, observándose un aumento progresivo a lo largo del tiempo. Por el contrario, las muestras tratadas con BAC, si bien mostraron una recuperación a los 19 días (T2), posteriormente sufrieron una disminución sostenida. Al final del tratamiento (día 30 - T4), las aves suplementadas con taninos mantuvieron elevados los niveles de ASVs e índice de Shannon, mientras que la riqueza y diversidad para el tratamiento suplementado con bacitracina mostró valores menores a los del control.

Un análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas, fue realizado para determinar si existía algún agrupamiento entre las muestras (Figura 2.7). Si bien en el PCoA se observa un ordenamiento diferencial para las muestras tratada con TAN, el análisis de PERMANOVA no permitió detectar diferencias significativas entre los tratamientos, tanto para las distancias ponderadas como no ponderadas ( $p = 0,061$  y  $p = 0,073$ ).



**Figura 2.7. PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de las muestras de ciego provenientes del ensayo 1.** Cada color representa un tratamiento: BAC: dieta con aditivo de bacitracina, CON: dieta control, TAN: dieta con aditivo de taninos.

Los resultados del crecimiento de las aves en el ensayo experimental se muestran en la Tabla 2.3. El promedio del peso de los animales no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Tabla 2.3: Parámetros de crecimiento de animales en los diferentes grupos del ensayo 1.** Se expresan el peso promedio (n=5) ± desvío estándar para cada tiempo evaluado, por tratamiento.

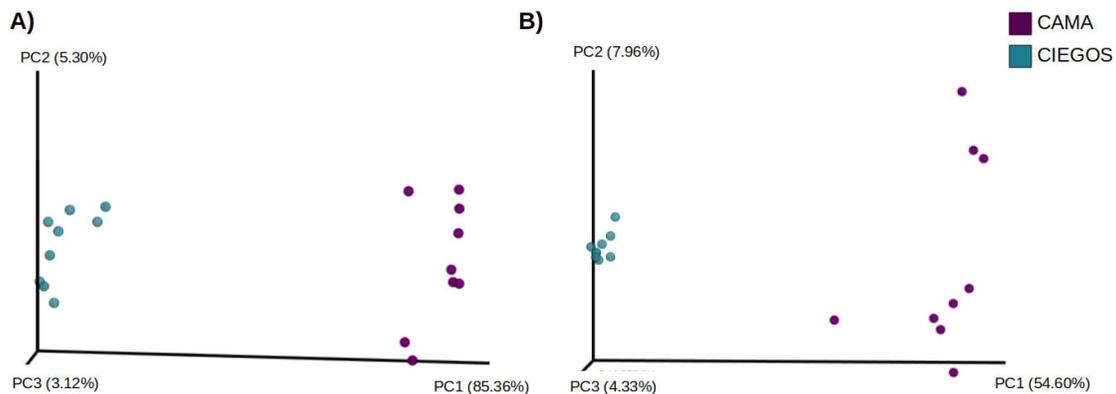
Parámetro	CON	BAC	TAN
Peso (g)			
Día 12	337±28	348±27	323±43
Día 19	777±68	821±77	768±106
Día 26	1444±122	1481±153	1452±224
Día 30	1814±222	1905±232	1798±310
FCR	1,83	1,92	1,99

CON: dieta control, BAC: dieta con aditivo de bacitracina, TAN: dieta con aditivo de taninos.

FCR: Índice de conversión alimenticio.

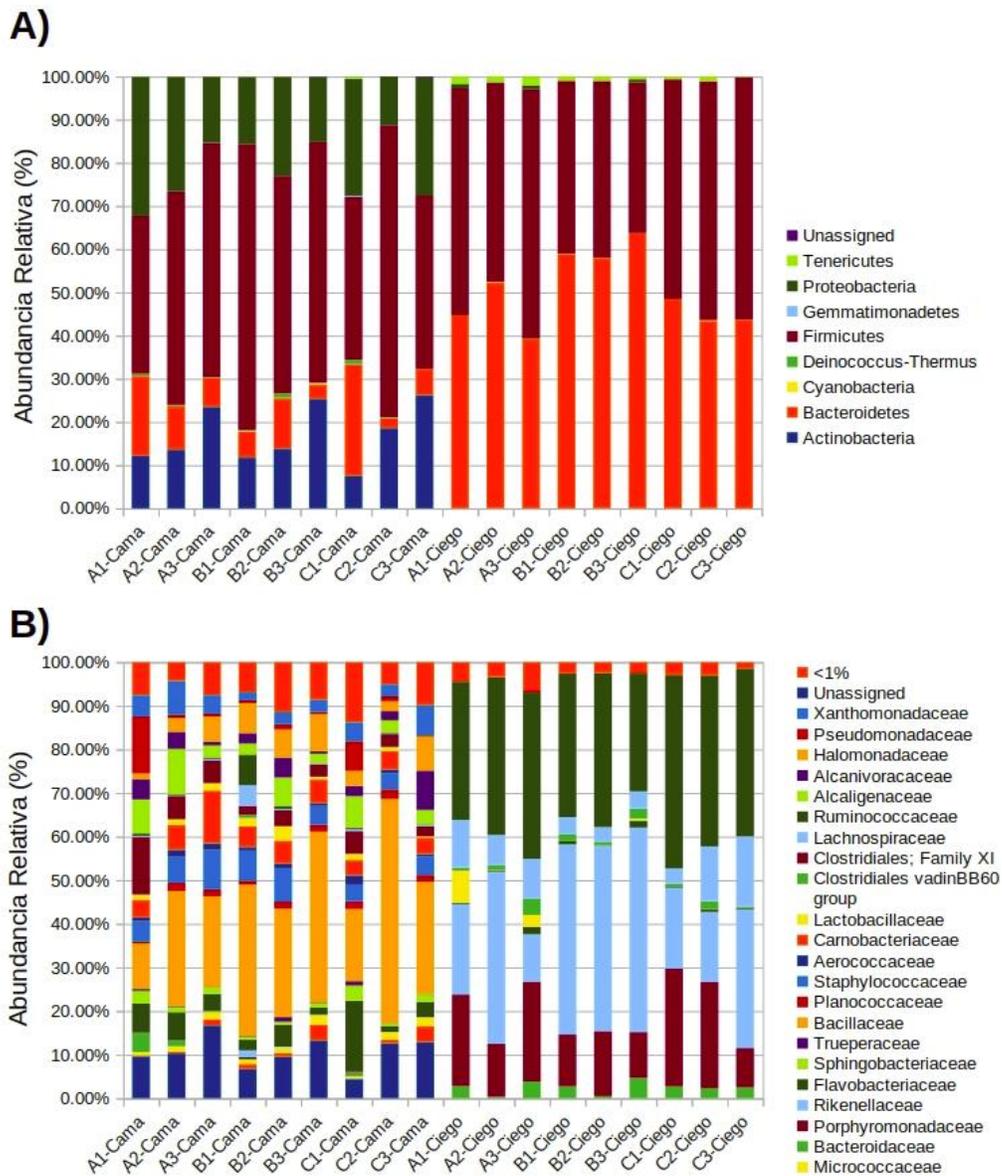
### 3.2 Ensayo 2: Ensayo en Granja Comercial

El análisis de la beta diversidad de las comunidades microbianas evaluadas, mostró una clara diferencia en la composición de los dos tipos de muestras (ciegos y camas). A continuación se adjuntan los PCoA de las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas (Figura 2.8), así como las diferencias entre tipos de muestras evaluadas estadísticamente con un análisis PERMANOVA (distancias UniFrac ponderadas: pseudo-F = 86,97,  $p = 0,001$ ; distancias UniFrac no ponderadas: pseudo-F = 17,94,  $p = 0,001$ ).

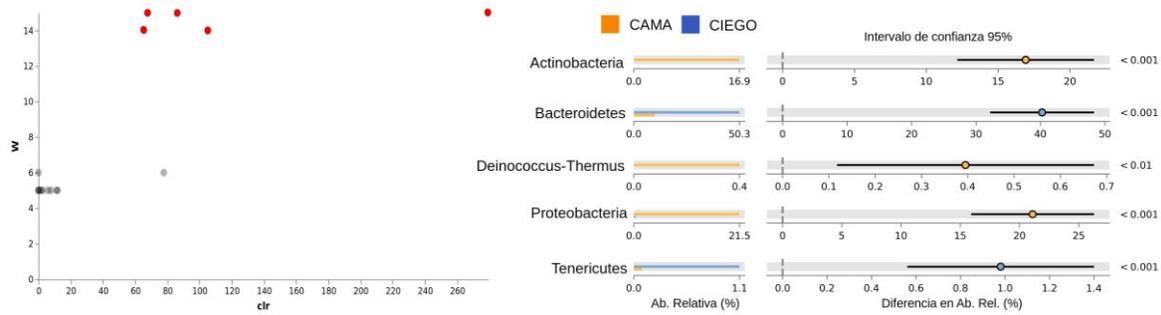


**Figura 2.8. PCoA de las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) entre muestras de ciego y cama provenientes del ensayo 2.**

Estas diferencias se vieron plasmadas en la composición de las comunidades bacterianas, cuando se evaluó la misma a diferentes niveles (Figura 2.9). El análisis ANCOM mostró diferencias estadísticamente significativas para los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Proteobacterias y Tenericutes (Figura 2.10); y en las clases Actinobacteria, Bacteroidetes Incertae Sedis, Bacteroidia, Shingobacteriia, Deinococci, Bacilli, Clostridia, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Mollicutes.



**Figura 2.9.** Composición de las comunidades de bacterias a nivel filo (a) y familia (b) de las muestras provenientes del ensayo 2. A: tratamiento control, B: Tratamiento con Bacitracina, C: Tratamiento con Taninos. 1, 2 y 3 representan las réplicas correspondientes a cada tratamiento.

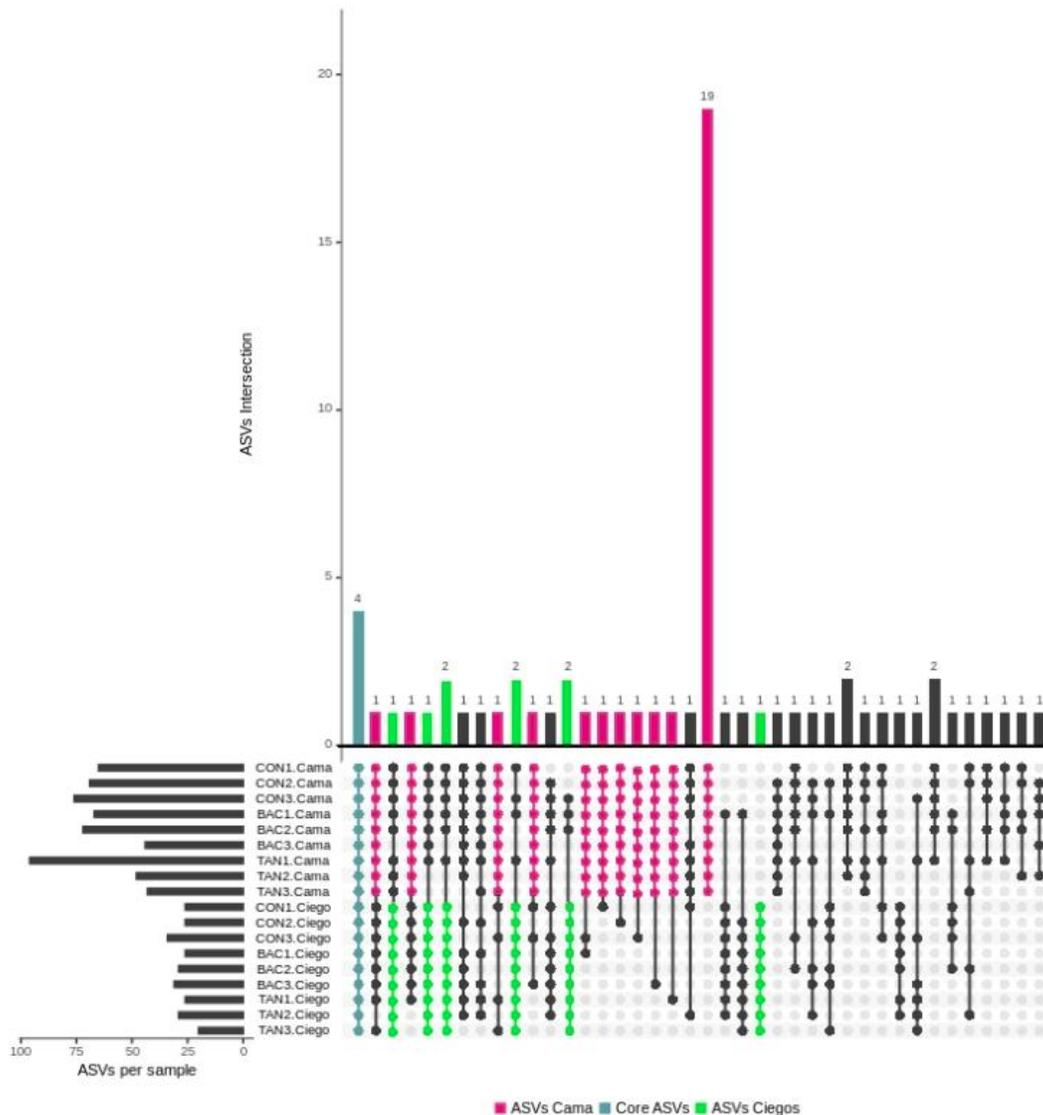


**Figura 2.10. Diferencias a nivel de filo encontradas entre los dos tipos de muestras evaluadas en el ensayo 2 (cama y ciegos).** Se muestran el diagrama de volcán del análisis ANCOM así como los resultados obtenidos en STAMP al comparar la composición de los fila bacterianos presentes en muestras de cama y ciego de pollos.

Al comparar las familias presentes en todas las muestras analizadas (9 muestras de cama de pollo y 9 muestras de ciegos), se encontraron 4 ASVs que conformaban el core taxonómico de las mismas. Estas ASV fueron clasificadas como las familias Bacteroidaceae, Flavobacteriaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae.

En relación a las muestras de cama, se encontraron 29 familias que estuvieron presentes en este tipo de muestras y en ninguna, o sólo en algunas, muestras de ciego: Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteraceae, Micrococcaceae, Familia del orden Micrococcales no clasificada, Nocardioseae, Familia no clasificada del Orden III de Bacteroidetes Incertae Sedis, Chitinophagaceae, Sphingobacteriaceae, Trueperaceae, Bacillaceae, Planococcaceae, Staphylococcaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Eubacteriaceae, Familia XI del orden Clostridiales, Alcaligenaceae, Familia del Orden Bradymonadales no clasificada, Alcanivoracaceae, Halomonadaceae, Pseudomonadaceae y Xanthomonadaceae.

Por su parte, las muestras de ciegos mostraron 9 familias que aparecieron sólo en estas muestras, o también presentes sólo en algunas muestras de cama, siendo éstas las familias: Porphyromonadaceae, Rikenellaceae, Christensenellaceae, Clostridiales vadin BB60 group, Familia XIII del orden Clostridiales, Peptococcaceae, Erysipelotrichaceae y dos familias no clasificadas del Orden Mollicutes RF9 (Figura 2.11).

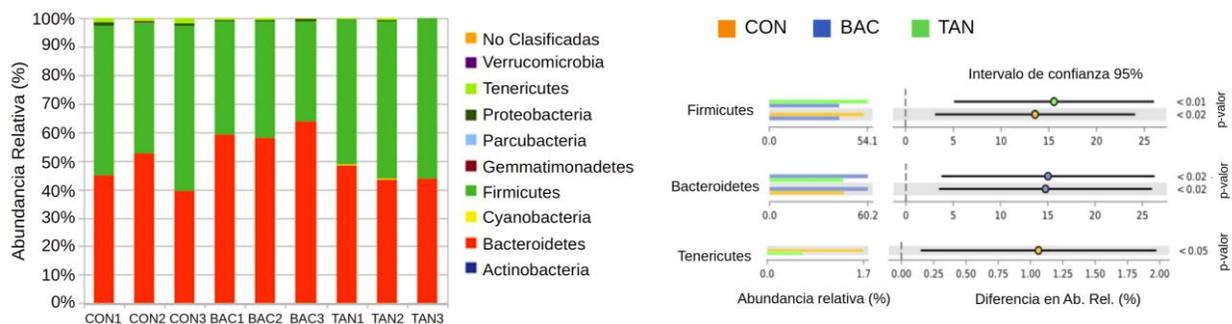


**Figura 2.11. ASVs presentes y compartidas entre muestras analizadas de cama y ciegos provenientes del ensayo 2.** CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con suplementación de Bacitracina, TAN: tratamiento con suplementación de Taninos. 1, 2 y 3 representan las tres réplicas realizadas por tratamiento.

Dadas estas diferencias en las estructuras de las comunidades bacterianas de cama y de ciegos, se decidió evaluar cada uno de los tipos de muestras por separado, para analizar la modulación que las mismas sufrían debido a los tratamientos dietarios.

### 3.2.1 Caracterización de ciegos

A nivel filo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en tres filos al comparar la composición de las comunidades microbianas en ciegos: Firmicutes, Bacteroidetes y Tenericutes. Los tratamientos CON y TAN fueron dominados por Firmicutes (CON: 52,08% y TAN: 54,06%) seguidos por Bacteroidetes (CON: 45,44% y TAN: 45,16%), mientras que el tratamiento con BAC mostró el patrón inverso (Firmicutes: 38,52% y Bacteroidetes: 60,18%). Además se encontraron Tenericutes en baja proporción (CON: 1,68%, BAC: 0,89% y TAN: 0,62%) y menores aún de Proteobacterias (CON: 0,72%, BAC: 0,32% y TAN: 0,06%) (Figura 2.12).



**Figura 2.12. Gráfico de composición de las comunidades microbianas de ciegos a nivel filo del ensayo 2.** CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con suplementación de Bacitracina, TAN: tratamiento con suplementación de Taninos. 1, 2 y 3 representan las tres réplicas realizadas por tratamiento.

Diferentes grupos bacterianos fueron afectados por la adición de taninos o bacitracina a la dieta. En el tratamiento con BAC, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el filo Bacteroidetes, debido a aumentos en la clase Bacteroidia (CON: 44,67%, BAC: 59,38% y TAN: 44,77%); mientras que la disminución en el filo Firmicutes se vio reflejada principalmente en la clase Clostridia (CON: 47,66%, BAC: 38,16% y TAN: 53,47%). Patrones inversos se vieron en los tratamientos CON y TAN. Se observaron además diferencias estadísticamente significativas en la clase Mollicutes (CON: 1,68%, BAC: 0,89% y TAN: 0,62%).

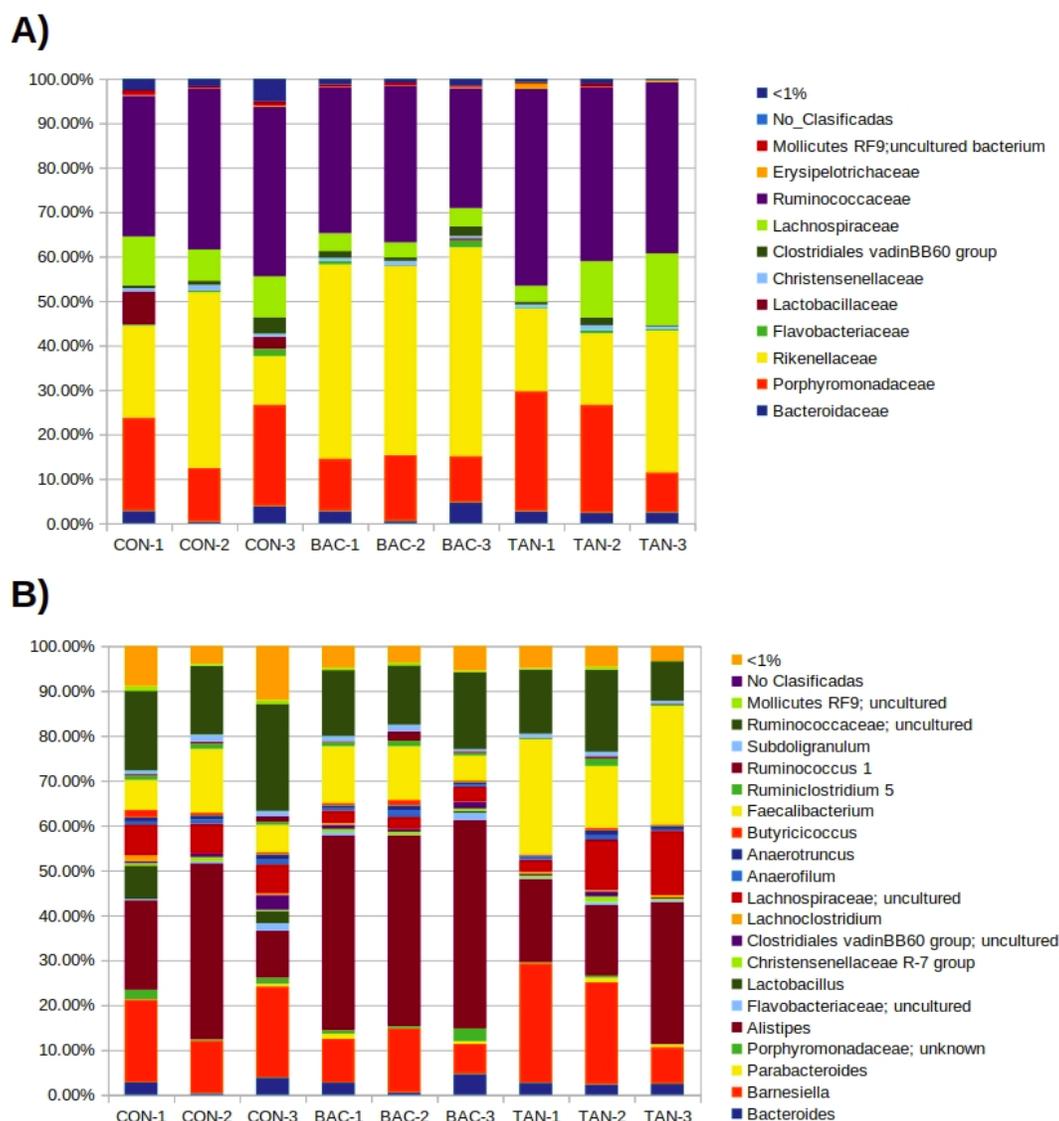
Las principales familias que se vieron modificadas entre los tratamientos fueron: Porphyromonadaceae y Rickenellaceae pertenecientes al filo Bacteroidetes, y Lactobacillaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae del filo Firmicutes. Dentro del filo Bacteroidetes, las familias Porphyromonadaceae y Rickenellaceae mostraron patrones inversos, con valores que disminuyen en el tratamiento de BAC para la familia Porphyromonadaceae (CON: 18,69%, BAC: 12,42% y TAN: 20,16%) y aumentan casi al doble, en el mismo tratamiento en el caso de la familia Rickenellaceae (CON: 23,65%, BAC: 44,32% y TAN: 22,12%).

Por su parte, las familias pertenecientes al filo Firmicutes mostraron patrones diferenciales para cada familia. Lactobacillaceae mostró una disminución en ambos tratamientos suplementados (CON: 3,42%, BAC: 0,18% y TAN: 0,01%), Lachnospiraceae disminuyó en el tratamiento suplementado con bacitracina (CON: 9,04%, BAC: 3,8% y TAN: 10,75%), mientras que Ruminococcaceae mostró una disminución en el tratamiento tratado con BAC y un aumento en el suplementado con TAN (CON: 35,32%, BAC: 31,72% y TAN: 40,67%) (Figura 2.13-a).

Los principales géneros que se vieron modificados por la adición de aditivos en la dieta fueron *Barnesiella*, *Alistipes* y un género no clasificado de la familia Porphyromonadaceae, todos pertenecientes al filo Bacteroidetes; y los géneros *Lactobacillus*, *Lachnostridium*, *Faecalibacterium*, un género no clasificado de la familia Lachnospiraceae y otro no clasificado de la familia Clostridiales, todos pertenecientes al filo Firmicutes.

Para los géneros del filo Bacteroidetes, se observó una disminución en la proporción de *Barnesiella* para el grupo de aves alimentadas con un suplemento de bacitracina (CON: 16,86%, BAC: 10,26% y TAN: 19,23%) que fue compensada por un aumento en las abundancias relativas de *Alistipes* (CON: 23,21%, BAC: 44,11% y TAN: 21,98%). Por su parte, el tratamiento con TAN mostró una disminución en un género no clasificado de la familia Porphyromonadaceae (CON: 1,26%, BAC: 1,38% y TAN: 0,27%) (Figura 2.13-b).

Para los géneros del filo Firmicutes se observó una disminución para el tratamiento suplementado con BAC en las abundancias relativas de *Lachnoclostridium* (CON: 0,58%, BAC: 0,16% y TAN: 0,43%) y de un género no clasificado de la familia Lachnospiraceae (CON: 6,66%, BAC: 2,94% y TAN: 9,37%). Por su parte, el tratamiento con TAN mostró una disminución en el contenido de un género no clasificado perteneciente a la familia Clostridiales (CON: 1,52%, BAC: 1,03% y TAN: 0,64%). Además, ambos tratamientos mostraron patrones diferentes al tratamiento control en los taxa *Lactobacillus* (CON: 3,42%, BAC: 0,18% y TAN: 0,01%) y *Faecalibacterium* (CON: 8,99%, BAC: 10,03% y TAN: 21,09%), con disminuciones o aumentos de estos géneros respectivamente (Figura 2.13-b).



**Figura 2.13.** Gráficos de composición de las comunidades microbianas de ciegos a nivel a) familia y b) género del ensayo 2. CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con Bacitracina, TAN: Tratamiento con Taninos. 1, 2 y 3 representan las réplicas correspondientes a cada tratamiento

La diversidad de las muestras (alfa diversidad) fue evaluada a través del número de ASVs observadas, índice de Pielou, Faith-PD e índice de Shannon. Los resultados pueden observarse en la Tabla 2.4. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Tabla 2.4. Valores de diversidad alfa evaluada en ciegos para los distintos tratamientos dietarios del ensayo 2.**

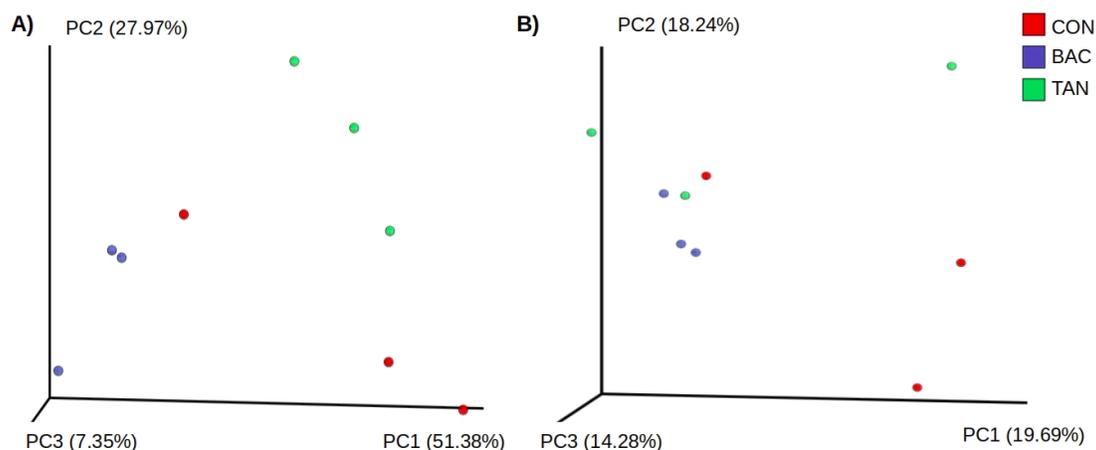
	CON	BAC	TAN
Índice de Pielou	0,71±0,1	0,59±0,03	0,64±0,07
Faith-PD	19,56±3,45	20,15±0,91	17,27±2,72
ASVs observados	323,67±74,33	320,33±21,59	259±71,58
Índice de Shannon	5,9±0,98	4,92±0,3	5,10±0,65

Los valores representados corresponden a la media±DE de las tres réplicas por tratamiento. CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con Bacitracina, TAN: tratamiento con Taninos.

Se analizaron, además, las curvas de rarefacción de las ASVs observadas e índice de Shannon (Apéndice 2.2). Las mismas permiten visualizar que todas las muestras llegaron al plateau, determinando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la diversidad bacteriana presente en las muestras de contenido cecal.

Un análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas, fue realizado para determinar si existía algún ordenamiento entre las muestras, en función de los aditivos dietarios (Figura 2.14). El PCoA reveló una diferencia en la composición de la microbiota tratada con TAN, indicando una modulación diferencial para este tratamiento. Así mismo, el análisis de PERMANOVA permitió

detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos sólo para las distancias ponderadas ( $p = 0,018$ ) y no así para las no ponderadas ( $p = 0,218$ ).



**Figura 2.14. PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de ciegos provenientes del ensayo 2.** Cada color representa un tratamiento: CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con Bacitracina, TAN: tratamiento con Taninos.

Los resultados relacionados con el crecimiento de las aves del presente ensayo realizado en granja comercial se muestran en la Tabla 2.5 y Apéndice 2.3. El promedio del peso de los animales no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Tabla 2.5. Parámetros de crecimiento de animales en los diferentes grupos del ensayo 2.**

Parámetro	CON	BAC	TAN
Peso (g)			
Corral 1	580±157	693±62	703±97
Corral 2	959±517	698±87	722±114
Corral 3	686±114	711±64	712±62

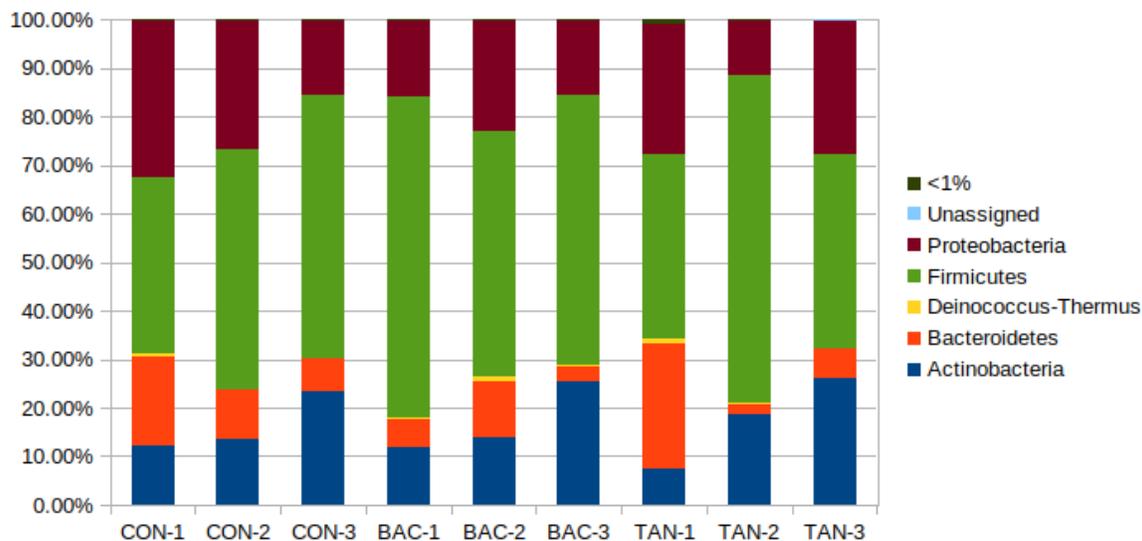
Se muestra el valor de la media ( $n=5$ )  $\pm$  DS de los pesos de los cinco animales por corral utilizados para armar el pool de muestras de cada tratamiento. CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con Bacitracina, TAN: tratamiento con Taninos.

### 3.2.2 Caracterización de cama de pollo

A nivel filo, la microbiota de la cama mostró un patrón diferencial respecto de los ciegos, aunque no lograron observarse claras diferencias entre los tratamientos evaluados (BAC, CON y TAN).

Las comunidades microbianas estuvieron dominadas por los filos Firmicutes (CON: 46,72%, BAC: 57,46% y TAN: 48,49%), seguido por Proteobacteria (CON: 24,70%, BAC: 17,84% y TAN: 21,88%), Actinobacteria (CON: 16,39%, BAC: 16,89% y TAN: 17,41%) y Bacteroidetes (CON: 11,72%, BAC: 6,97% y TAN: 11,38%) (Figura 2.15).

Diferentes grupos bacterianos fueron afectados por la adición de taninos o bacitracina a la dieta, aunque los mismos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En el tratamiento con BAC, las principales diferencias en el filo Bacteroidetes fueron debidas a disminuciones en las clases Flavobacteriia (CON: 5,73%, BAC: 3,04% y TAN: 6,94%) y Sphingobacteriia (CON: 2,2%, BAC: 0,99% y TAN: 2,41%). Por su parte, la clase Bacteroidia mostró disminuciones en ambos tratamientos complementados comparados con el control (CON: 3,18%, BAC: 0,91% y TAN: 0,8%).



**Figura 2.15. Gráfico de composición de las comunidades microbianas de camas del ensayo 2 a nivel filo.** Se muestra la estructura de la comunidad bacteriana para las tres réplicas de los diferentes tratamientos: CON: control, BAC: bacitracina, TAN: taninos.

Dentro del filo Firmicutes, las principales diferencias estuvieron dadas por modificaciones en las clases Bacilli y Clostridia, mostrando aumentos en ambos tratamientos para Bacilli (CON: 37,61%, BAC: 49,23% y TAN: 43,82%) y disminuciones para Clostridia (CON: 8,88%, BAC: 7,94% y TAN: 4,3%).

Entre las proteobacterias, la principal diferencia se observó en el tratamiento con BAC que disminuyó la abundancia relativa de las Gammaproteobacterias (CON: 17,19%, BAC: 13,38% y TAN: 16,55%).

Las principales familias que se vieron afectadas entre los tratamientos fueron Corynebacteriaceae y Dermabacteraceae para el filo Actinobacteria; Flavobacteriaceae y Sphingobacteriaceae para el filo Bacteroidetes; Bacillaceae, Staphylococcaceae, Carnobacteriaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y un miembro de la familia XI del

filo Firmicutes; y Alcaligenaceae, Halomonadaceae, Pseudomonadaceae y Xanthomonadaceae para el filo Proteobacteria.

En las familias del filo Actinobacteria se observó, para ambos tratamientos con aditivos, una disminución en la familia Corynebacteraceae y un aumento en la familia Dermabacteriaceae (CON: 12,19% y 0,72%, BAC: 9,83% y 1,86% y TAN: 9,34% y 1,55% respectivamente).

En las familias del filo Bacteroidetes se observó una disminución para el tratamiento con BAC (CON: 5,71% y 1,82%, BAC: 3,04% y 0,82% y TAN: 6,94% y 1,91% para Flavobacteriaceae y Sphingobacteriaceae respectivamente).

En las familias del filo Firmicutes se observó un aumento importante en ambos tratamientos suplementados para la familia Bacillaceae (CON: 19,17%, BAC: 32,91% y TAN: 31,23%). Otras familias de este filo vieron disminuidas sus abundancias relativas en estos tratamientos como ser, Staphylococcaceae que disminuyó para las muestras con TAN (CON: 6,58%, BAC: 6,30% y TAN: 3,88%), Carnobacteriaceae con disminuciones en ambos tratamientos (CON: 7,32%, BAC: 5,16% y TAN: 3,86%) y Clostridiales Familia XI con disminuciones en ambos (CON: 7,88%, BAC: 2,83% y TAN: 3,5%). Por su parte dos familias mostraron aumentos sólo en el tratamiento con BAC (Lachnospiraceae y Ruminococcaceae con abundancias de CON: 0,27% y 0,37%, BAC: 1,76% y 2,57%; y TAN: 0,29% y 0,24% respectivamente) (Figura 2.16-a).

Pertenecientes al filo Bacteroidetes, los principales géneros que se vieron modificados por los tratamientos fueron *Bacteroides* (CON: 1,89%, BAC: 0,12% y TAN: 0,34%), *Moheibacter* (CON: 3,8%, BAC: 1,31% y TAN: 3,7%) y *Ulvibacter* (CON: 1,82%, BAC: 1,52% y TAN: 3,18%). Por su parte, dentro del filo Firmicutes, los principales géneros afectados fueron *Oceanobacillus* (CON: 0,78%, BAC: 2,01% y TAN:

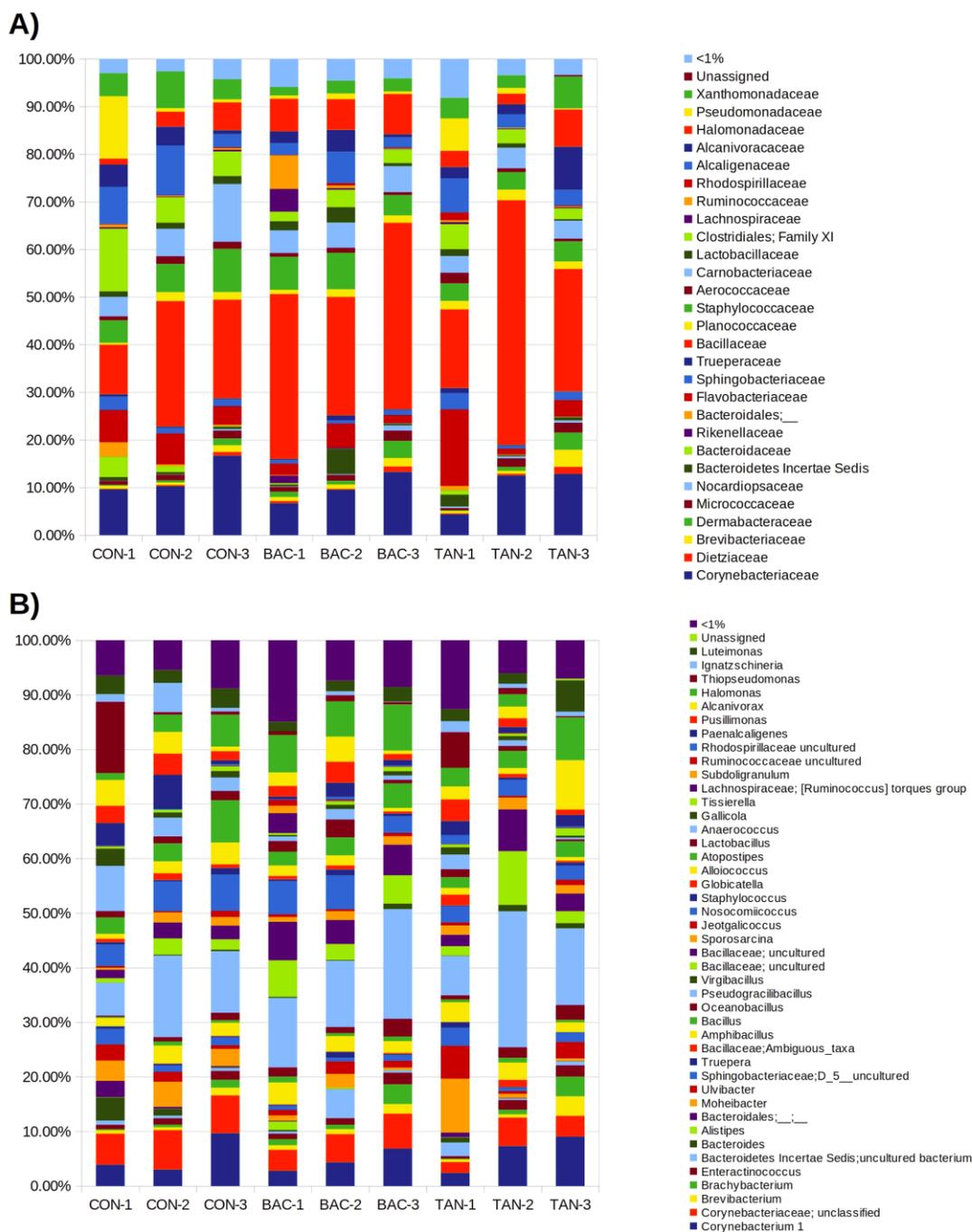
1,79%), *Pseudogracilibacillus* (CON: 10,76%, BAC: 14,99% y TAN: 15,39%), *Nosocomiicoccus* (CON: 5,33%, BAC: 5,13% y TAN: 2,83%), *Alloiococcus* (CON: 2,36%, BAC: 1,45% y TAN: 0,98%), *Atopostipes* (CON: 4,69%, BAC: 3,45% y TAN: 2,68%), *Anaerococcus* (CON: 4,72%, BAC: 1,17% y TAN: 1,35%) y *Gallicola* (CON: 1,77%, BAC: 0,62% y TAN: 0,83%). Por último, dentro del filo Proteobacteria se observaron diferencias en los géneros *Paenalcaligenes* (CON: 3,72%, BAC: 1,36% y TAN: 1,93%), *Halomonas* (CON: 3,44%, BAC: 7,247% y TAN: 4,51%), *Thiopseudomonas* (CON: 4,69%, BAC: 0,73% y TAN: 2,63%) y *Ignatzschineria* (CON: 2,46%, BAC: 0,27% y TAN: 1,19%) (Figura 2.16-b).

La diversidad de las muestras (alfa diversidad) fue evaluada a través del número de ASVs observadas, índice de Pielou, Faith-PD e índice de Shannon. Los resultados pueden observarse en la Tabla 2.6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Tabla 2.6. Valores de diversidad alfa evaluada para las camas de los distintos tratamientos dietarios utilizados en el ensayo 2.**

	CON	BAC	TAN
Índice de Pielou	0,76±0,01	0,77±0,01	0,79±0,01
Faith-PD	22,89±0,71	22,32±6,95	20,42±6,36
ASVs observados	318,33±19,55	282,67±110,25	255,67±136,83
Índice de Shannon	6,36±0,07	6,24±0,56	6,24±0,63

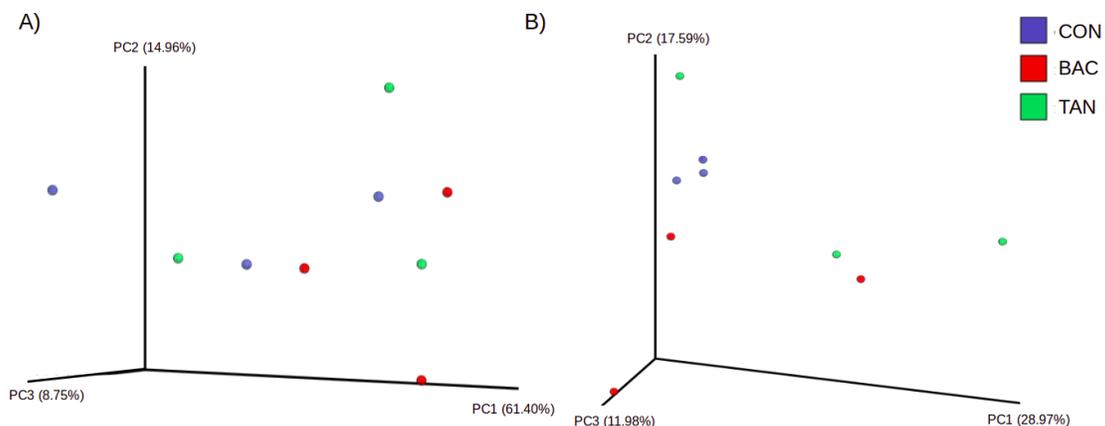
Los valores representados corresponden a la media±DE de las tres réplicas por tratamiento. CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con Bacitracina, TAN: tratamiento con Taninos.



**Figura 2.16. Gráficos de composición de las comunidades microbianas de camas del ensayo 2 evaluadas a nivel a) familia y b) género. Se muestra la estructura de las comunidades para las tres réplicas por tratamiento: CON: control, BAC: bacitracina, TAN: taninos.**

Se analizaron, además, las curvas de rarefacción de las ASVs observadas e índice de Shannon (Apéndice 2.4). Las mismas permiten visualizar que todas las muestras llegaron al plateau, determinando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la diversidad bacteriana presente en las muestras de cama.

Un análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas, fue realizado para determinar si existía algún agrupamiento entre las muestras en función de los aditivos dietarios (Figura 2.17). El PCoA no reveló una diferencia en la composición de la microbiota tratada con diferentes aditivos. Así mismo, el análisis de PERMANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas en las distancias UniFrac ponderadas ( $p = 0,49$ ) y no ponderadas ( $p = 0,52$ ), entre los tratamientos.

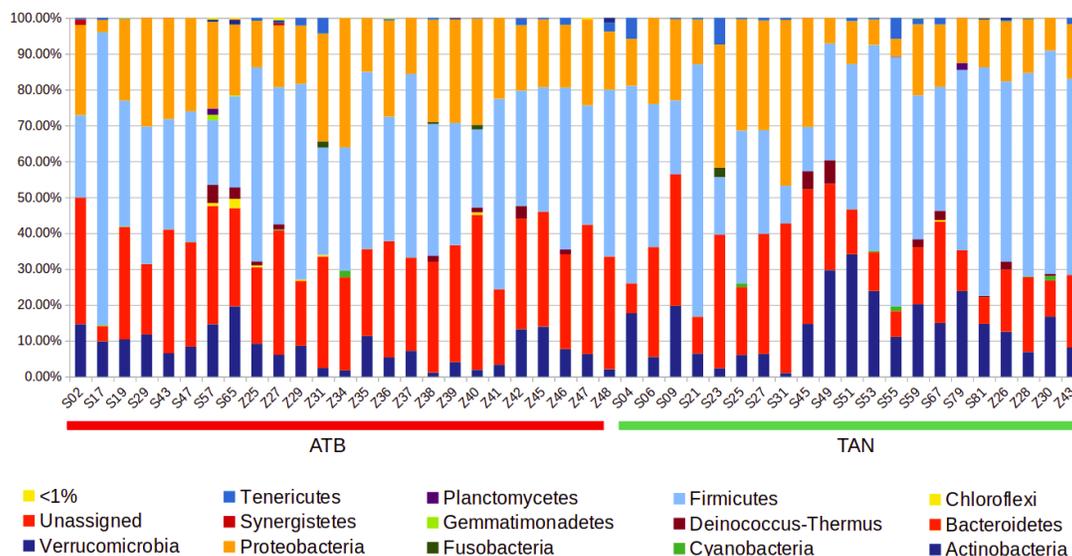


**Figura 2.17. PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de las muestras de cama del ensayo 2.** Cada color representa un tratamiento. CON: tratamiento control, BAC: tratamiento con Bacitracina, TAN: tratamiento con Taninos.

### 3.3 Ensayo 3: Muestreo de camas de pollo en granjas comerciales

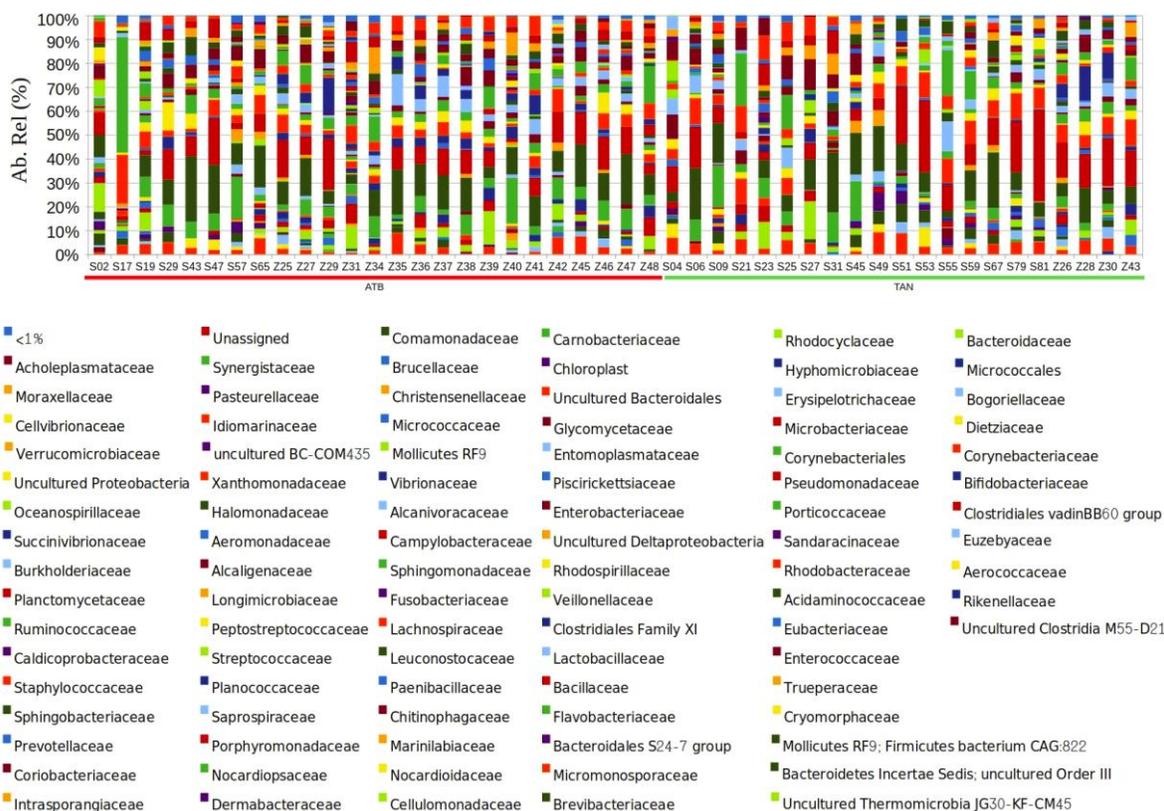
A nivel filo, la microbiota de las camas mostró un patrón semejante al observado en las camas del ensayo en granja, encontrándose que las comunidades estaban dominadas por los filos Firmicutes (ATB: 38,90% y TAN: 43,28%), Bacteroidetes (ATB: 28,50% y TAN: 20,97%), Proteobacteria (ATB: 22,14% y TAN: 18,79%) y Actinobacteria (ATB: 8,06% y TAN: 14,13%) (Figura 2.18). A pesar de estas diferencias, el filo Bacteroidetes fue el único que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Las principales diferencias en el filo Actinobacteria se manifestaron en la clase Actinobacteria (ATB: 7,84% y TAN: 13,72%). En el filo Bacteroidetes se observaron cambios en las clases Bacteroidia (ATB: 7,98% y TAN: 4,65%), Flavobacteriia (ATB: 6,68% y TAN: 4,45%) y Sphingobacteriia (ATB: 13,13% y TAN: 11,78). Por su parte el filo Firmicutes mostró diferencias en las clases Bacilli (ATB: 25,83% y TAN: 32,85%), Clostridia (ATB: 11,47% y TAN: 9,67%) y Negativicutes (ATB: 1,12% y TAN: 0,5%). Por último, el filo Proteobacteria mostró diferencias en las clases Betaproteobacteria (ATB: 4,21% y TAN: 3,43%) y Gammaproteobacteria (ATB: 5,87% y TAN: 13,3%). A pesar de estas observaciones, el análisis ANCOM sólo detectó diferencias estadísticamente significativas en la clase Flavobacteriia (Tabla 2.7).



**Figura 2.18. Gráfico de composición de las comunidades microbianas de camas de granjas comerciales a nivel filo.** Cada barra representa una muestra. A la izquierda del gráfico se encuentran agrupadas muestras correspondientes al tratamiento suplementado con antibiótico (ATB) y a la derecha, aquellas suplementadas con taninos (TAN).

Si bien se observaron diferencias en las abundancias de las familias *Corynebacteraceae*, *Dietziaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Dermabacteraceae*, *Micrococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rickenellaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Staphylococcaceae*, la familia XI del orden Clostridiales, *Alcaligenaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*; la única que mostró diferencias estadísticamente significativas fue *Xanthomonadaceae* (BAC: 3,31% y TAN: 2,25) (Figura 2.19 y Tabla 2.7).

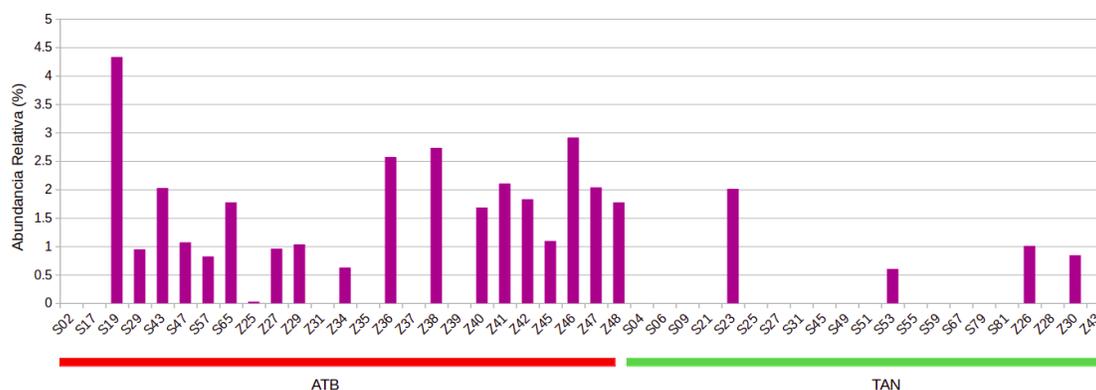


**Figura 2.19. Gráfico de composición microbiana de camas de granjas comerciales evaluadas a nivel familia.** Cada barra representa una muestra individual. Las muestras agrupadas del lado izquierdo del gráfico, corresponden a aquellas con suplementación antibiótica (ATB). Las muestras agrupadas del lado derecho, corresponden a aquellas suplementadas con taninos (TAN).

A nivel género sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el género *Moheibacter* (BAC: 1,29% y TAN: 0,21%) perteneciente a la familia Flavobacteriaceae de la clase Flavobacteriia (Tabla 2.7 y Figura 2.20).

**Tabla 2.7. Diferencias encontradas entre las camas de granjas comerciales al realizar el análisis de ANCOM.** ATB: promedio de abundancias relativas de las muestras con suplementación antibiótica, TAN: promedio de las abundancias relativas de las muestras con suplementación de taninos.

ASV ID	W	Clr	Ab. Rel. ATB	Ab. Rel. TAN
<b>Filo</b>				
Bacteroidetes	5	14,24	28,5±7,67	20,99±11,4
<b>Clase</b>				
Flavobacteriia	17	11,17	6,68±4,65	4,45±5,41
<b>Orden</b>				
Xanthomonadales	44	14,30	3,32±2,15	2,25±2,95
Flavobacteriales	37	13,34	6,68±4,65	4,45±5,41
<b>Familia</b>				
Xanthomonadaceae	68	14,86	3,31±2,15	2,25±2,95
<b>Género</b>				
Moheibacter	169	17,86	1,29±1,13	0,21±0,51



**Figura 2.20. Abundancias relativas del género *Moheibacter* para las muestras de cama de pollo provenientes de granjas comerciales.** Las muestras de la izquierda corresponden a suplementación con antibióticos (ATB), mientras que las agrupadas del lado derecho a aquellas muestras suplementadas con taninos (TAN).

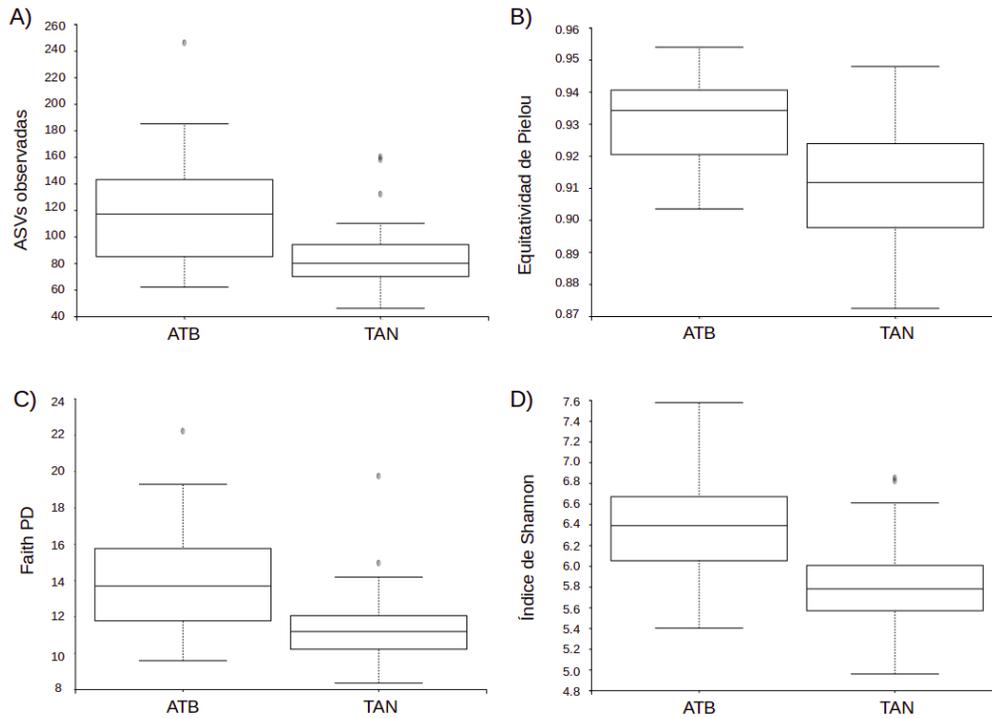
La diversidad de las muestras (alfa diversidad) fue evaluada a través del número de ASVs observadas, índice de Pielou, Faith-PD e índice de Shannon (Tabla 2.8). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el número de ASVs observadas ( $p = 0,0041$ ), índice de Pielou ( $p = 0,0004$ ), Faith-PD ( $p = 0,0016$ ) e índice de Shannon ( $p = 0,0016$ ) (Figura 2.21).

**Tabla 2.8. Valores de diversidad alfa evaluada para las camas comerciales sometidas a los distintos tratamientos dietarios.** ATB: suplementación antibiótica, TAN: suplementación con taninos.

	ATB	TAN
Índice de Pielou	0,93±0,01 <sup>a</sup>	0,91±0,02 <sup>b</sup>
Faith-PD	14,12±3,05 <sup>a</sup>	11,56±2,48 <sup>b</sup>
ASVs observados	121,52±44,24 <sup>a</sup>	87,29±30,66 <sup>b</sup>
Índice de Shannon	6,37±0,55 <sup>a</sup>	5,81±0,50 <sup>b</sup>

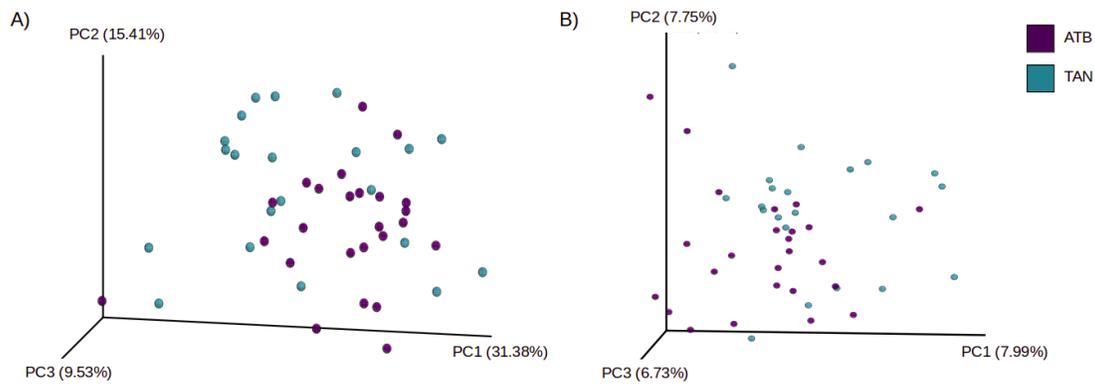
Los valores representados corresponden a la media±DE de las tres réplicas por tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas al realizar el test de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ).

Se realizaron, además, las curvas de rarefacción de las ASVs observadas e índice de Shannon (Apéndice 2.5). Las mismas permiten visualizar que todas las muestras llegaron al plateau, determinando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la diversidad bacteriana presente en las muestras de cama.



**Figura 2.21. Gráficos de caja (Boxplots) para los índices de alfa diversidad evaluada en muestras de camas de granjas comerciales por tratamiento.** ATB: muestras suplementadas con antibiótico, TAN: muestras suplementadas con taninos. Se representan a) ASVs observadas, b) índice de Pielou, c) Faith-PD y d) índice de Shannon. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el número de ASVs observadas ( $p = 0,0041$ ), índice de Pielou ( $p = 0,0004$ ), Faith-PD ( $p = 0,0016$ ) e índice de Shannon ( $p = 0,0016$ ).

Un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas, fue realizado para determinar si existía algún ordenamiento entre las muestras en función de los aditivos dietarios (Figura 2.22). Si bien en el PCoA no se observa una clara diferencia en la composición de la microbiota tratada con diferentes aditivos, el análisis de PERMANOVA permitió encontrar diferencias estadísticamente significativas en las distancias ponderadas ( $p = 0,017$ ) y en las no ponderadas ( $p = 0,002$ ).



**Figura 2.22. PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de las muestras de cama de granjas comerciales.** Cada color representa un tratamiento. ATB: tratamiento con antibiótico, TAN: tratamiento con taninos.

### 3.4 Comparación de la microbiota de camas de los Ensayo 2 y 3.

Se realizó una comparación de las ASVs encontradas en las camas de pollo del ensayo de granja y de aquellas presentes en las muestras realizadas mediante muestreos de granjas comerciales. Los resultados pueden observarse en la Figura 2.23.

Se encontraron nueve familias presentes en todas las muestras analizadas, tanto en las camas provenientes del ensayo realizado en granja, así como en las camas provenientes de los muestreos de granjas comerciales. Estas familias fueron clasificadas taxonómicamente como *Corynebacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae* y *Alcaligenaceae*.



## 4 Discusión

### 4.1 Ensayo 1: Ensayo bajo condiciones controladas.

Para comprender los mecanismos subyacentes de la promoción de crecimiento que producen tanto los antibióticos como los aditivos dietarios alternativos, es necesaria una descripción detallada de los efectos que ellos producen. Se cree que las mejoras en la conversión alimenticia, asociadas con la suplementación con antibióticos, involucran cambios o modificaciones en las comunidades microbianas gastrointestinales, pero esta conexión es aún poco conocida.

El establecimiento de la microbiota del TGI es un proceso complejo que está influenciado por numerosos factores que incluyen la genética del huésped, la salud intestinal, el estrés, la edad, las condiciones de crecimiento, la dieta y el uso de aditivos alimenticios (Oakley *et al.*, 2014; Pan y Yu, 2014; Wang *et al.*, 2016). En el presente capítulo, se utilizó la secuenciación masiva de amplicones del gen ARNr 16S para comparar la composición bacteriana de la microbiota cecal en pollos suplementados con bacitracina o taninos, durante un ciclo de producción de 4 semanas. La suplementación con estos dos aditivos, mostró tener un impacto diferencial en la microbiota de los ciegos, afectando cada aditivo a diferentes grupos bacterianos.

Los análisis de los índices de diversidad, indicaron que la riqueza y la diversidad microbiana, cambiaron tanto con la edad de los animales, así como con los tratamientos dietarios. En este sentido, diversos autores han descrito que la diversidad bacteriana en los ciegos aumenta con la edad de las aves (Danzeisen *et al.*, 2011; Mohd Shaufi *et al.*, 2015; Oakley *et al.*, 2014). Nuestros resultados corroboran esta observación, ya que el índice de

diversidad de Shannon fue mayor en el día 30 (T4) que en el día 12 (T1) para todos los grupos, mostrando el tratamiento con taninos un aumento más pronunciado.

Contrariamente, otros autores encontraron que tanto la bacitracina, como otros antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, no mostraban diferencias estadísticamente significativas en la diversidad microbiana (Fasina *et al.*, 2016; Neumann y Suen, 2015; Pourabedin *et al.*, 2015), aunque sí describieron cambios en la abundancia relativa de ciertos taxa en cada caso.

Aunque se han realizado numerosas investigaciones acerca de los efectos de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, sobre la composición de la microbiota intestinal de las aves de corral, todavía es escasa la información sobre el impacto de los aditivos fitogénicos. Los diferentes taninos, incluidos los derivados del castaño y del quebracho (como los utilizados en este trabajo), han mostrado tener actividad antagonica contra *Clostridium perfringens* y otros patógenos avícolas tanto *in vitro* como *in vivo* (Diaz Carrasco *et al.*, 2016). Un estudio realizado alimentando pollos con productos derivados de uvas, ricos en taninos, mostraron una mayor diversidad en los ciegos de estos animales y dichos efectos se correlacionaron con recuentos más altos de *Lactobacillus* y *Enterococcus* a los 21 días de edad (Viveros *et al.*, 2011). Nuestros resultados indicaron que la administración de taninos en la dieta aumentó tanto la riqueza como la diversidad cecal a lo largo del ensayo. Este efecto se podría asociar con un aumento en la abundancia de miembros de la familia Ruminococcaceae y del género *Alistipes* respecto al control, y una disminución de los géneros *Bacteroides* y *Sutterella*.

Algunos autores encontraron que se producía un enriquecimiento en diferentes miembros del orden Clostridiales con la suplementación dietaria de antibióticos, incluyendo cambios en Clostridiales que no lograron ser clasificados y miembros de las familias

Ruminococcaceae y Lachnospiraceae (Lin *et al.*, 2013; Neumann y Suen, 2015; Singh *et al.*, 2013). Además, se ha sugerido que estos microorganismos podrían desarrollarse como probióticos avícolas (Fasina *et al.*, 2016; Stanley *et al.*, 2016; Torok *et al.*, 2011a).

Por otro lado, la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota intestinal se ha relacionado con la eficiencia energética en animales, incluidos ratones, cerdos, vacas y humanos (Jami *et al.*, 2014; Turnbaugh *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2015). Algunos estudios encontraron una correlación positiva entre la relación F/B y el índice de conversión alimenticia, tanto en la microbiota cecal (Singh *et al.*, 2013) como fecal (Singh *et al.*, 2012) de pollos. Sin embargo, otros autores no lograron correlacionar de forma significativa esta relación F/B con el crecimiento de los animales (peso corporal) (Han *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, todas las muestras analizadas, independientemente del tratamiento dietario, mostraron que la microbiota cecal estuvo dominada por los filos Firmicutes y Bacteroidetes, representando más del 90% de las bacterias presentes. Particularmente, un aumento significativo en la relación F/B fue observado en los animales tratados con taninos, en comparación con los grupos CON y BAC, pero este aumento no mostró correlación con un aumento en el peso de los animales.

Respecto a los Firmicutes, la mayor abundancia de miembros del orden Clostridiales se ha relacionado con aumentos en el rendimiento de los animales al analizar tanto la microbiota cecal (Stanley *et al.*, 2016, 2012; Torok *et al.*, 2011b) como la fecal (Singh *et al.*, 2012). Sin embargo, se requieren más investigaciones para saber cuáles son los taxa específicos de este orden que se asocian a la promoción del crecimiento, con el fin de identificar y desarrollar nuevos probióticos y prebióticos para aves de corral. La presencia de bacterias probióticas en el intestino del pollo se asocia con una mejora en los

parámetros de rendimiento y una reducción de las cargas de patógenos (Angelakis y Raoult, 2010; Kabir, 2009; Stanley *et al.*, 2014).

Muchos estudios han documentado una disminución en las abundancias relativas de bacterias probióticas en el TGI de pollo luego de la administración de antibióticos, afectando este aditivo tanto a lactobacilos, bifidobacterias y/o enterococos (Baurhoo *et al.*, 2009; Danzeisen *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013). Las bacterias ácido lácticas, especialmente los *Lactobacillus*, son considerados excelentes microorganismos probióticos debido a su capacidad para disminuir la incidencia de enfermedades entéricas y lograr mantener la salud de las aves de corral (Kabir, 2009). En este trabajo, el género *Lactobacillus* no mostró un patrón diferencial para los tratamientos evaluados.

La fermentación de carbohidratos vegetales no digeribles, que realizan las bacterias en organismos herbívoros, conduce a la formación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas del inglés), principalmente acetato, propionato y butirato. La proporción de cada uno de estos SCFA se ha relacionado con la composición de la microbiota presente en los ciegos en aves de corral (Rehman *et al.*, 2007).

Nuestros resultados muestran que el género *Bacteroides* se redujo drásticamente en el tratamiento con taninos pero no así en el de bacitracina, y esta disminución fue compensada principalmente por el aumento de Bacteroidetes de la familia Rikenellaceae, así como en un aumento de Firmicutes de la familia Ruminococcaceae. Otros estudios, de forma similar, encontraron que los polifenoles pueden inhibir el crecimiento de ciertos *Bacteroides*, mientras que otras especies dentro de este género pueden verse favorecidas (Cardona *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que los *Bacteroides* (Gram-negativas) tienen mayor capacidad que las bacterias Gram-positivas, como los Firmicutes, para degradar almidón hidrolizable,

mientras que las Gram-positivas se especializan en la degradación de una amplia variedad de sustratos recalcitrantes y persisten como parte de las comunidades fibrolíticas (Biddle *et al.*, 2013). Los bacteroides son microorganismos sacarolíticos y proteolíticos que juegan un papel importante en la descomposición de macromoléculas complejas, generando acetato y propionato como principales productos de fermentación (den Besten *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2006).

Por su parte, la familia Rikenellaceae suele describirse como altamente susceptible a perturbaciones en la microbiota intestinal, como las causadas por antibióticos o suplementos de probióticos (Clarke *et al.*, 2013; Downward *et al.*, 2013) y se ha encontrado enriquecida en muestras fecales de ratones que mostraban obesidad inducida por una dieta alta en grasas (Daniel *et al.*, 2014).

Por otro lado, el orden Clostridiales al que pertenece la familia Ruminococcaceae, abarca principalmente bacterias no patogénicas, incluidas aquellas que se han asociado con la prevención de enfermedades inflamatorias intestinales y el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa, atribuido a la capacidad de los clostridios para producir butirato (Lopetuso *et al.*, 2013).

Algunos estudios encontraron que el butirato reduce algunos patógenos, como *Salmonella* en aves de corral, y mejora el crecimiento de células epiteliales en lechones (Kien *et al.*, 2007; Van Immerseel *et al.*, 2005). Estos clostridios productores de butirato, se han aislado del contenido cecal de pollos de engorde (Eeckhaut *et al.*, 2011) y de gallinas ponedoras, y se ha observado una mayor concentración cecal de butirato en aves con suplementación dietaria de polifenoles de té (Yuan *et al.*, 2016). Así mismo, estas aves suplementadas con polifenoles, mostraron una reducción del número de células que sufrían

apoptosis al ser expuestas a elementos traza que inducen la disfunción gastrointestinal (Yuan *et al.*, 2016).

Es posible entonces, que el aumento de miembros de la familia Ruminococcaceae, observados en los pollos alimentados con taninos en nuestro trabajo, pueda alterar el perfil de SCFA en los ciegos hacia la producción de butirato. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para poder corroborar esta hipótesis y relacionarla con la reducción de patógenos y mejora en la salud del TGI.

## **4.2 Ensayo 2: Ensayo en Granjas Comerciales**

Como se dijo previamente, el establecimiento de la microbiota del TGI en las aves de corral es un proceso complejo que está influenciado por diversos factores. Decidimos comparar, en este trabajo, la modulación que sufría la microbiota al adicionar a la dieta distintos promotores de crecimiento en dos ambientes diferentes, los ensayos experimentales y los ambientes comerciales.

Los resultados obtenidos muestran diferentes patrones de modulación de los aditivos en función del ambiente. Si bien los análisis de los índices de diversidad alfa no mostraron diferencias entre tratamientos en las granjas comerciales, si se observaron diferencias en las distancias UniFrac ponderadas. Además, algunos taxa mostraron diferentes patrones de comportamiento en función de los tratamientos y estas diferencias no necesariamente fueron similares a las observadas en los ensayos experimentales.

Al igual que en los ensayos experimentales, los principales filos encontrados en todas las muestras analizadas fueron Firmicutes y Bacteroidetes.

Los principales taxa afectados por la suplementación dietaria fueron las clases Bacteroidia y Clostridia, siendo las familias con mayores cambios en sus abundancias relativas Porphyromonadaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae (Figura 2.13).

Como se dijo previamente, miembros del orden Clostridiales se relacionaron con aumentos en el rendimiento y, en este sentido, la suplementación dietaria con bacitracina mostró disminución en la clase Clostridia, principalmente en la familia Lachnospiraceae. Por su parte, el tratamiento con taninos mostró un aumento en la familia Ruminococcaceae, perteneciente a esa misma clase.

Tanto los ensayos experimentales como los realizados en granjas comerciales, mostraron patrones similares en los cambios de abundancias de las clases Clostridia y Bacteroidia, así como en las familias mencionadas anteriormente. La única excepción puede observarse en la familia Rikenellaceae, que muestra un aumento en el tratamiento con TAN en los ensayos experimentales y un aumento en el tratamiento con BAC en las granjas comerciales.

Otra gran diferencia encontrada entre los ambientes evaluados, fue el comportamiento de los *Lactobacillus*. Como se mencionó anteriormente, este grupo de bacterias es considerado como probiótico y se le adjudican efectos benéficos en el TGI de las aves. Si bien no se encontraron diferencias en el patrón de estas bacterias en los ensayos experimentales, en las granjas comerciales pudo observarse una disminución en ambos tratamientos (Taninos y Bacitracina), y estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores (Baurhoo *et al.*, 2009; Danzeisen *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013).

## 4.3 Camas de pollos

### 4.3.1 Camas de pollo provenientes del Ensayo 2

La composición de la cama de pollo mostró claras diferencias respecto de la microbiota de ciegos, con presencia de taxa exclusivos que no se encontraron presentes en el TGI. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la estructura de las comunidades bacterianas al comparar las camas de los diferentes tratamientos. Esto puede deberse, en parte, a que el ensayo contó con un único ciclo productivo y, tal vez, sea necesaria la ocurrencia de ciclos sucesivos, que aumenten la carga microbiana presente en la cama proveniente de las excretas, para poder observar más fielmente representadas las comunidades características de cada tratamiento y recuperar las diferencias existentes. Esta hipótesis, podría sustentarse en que al analizar las diferencias entre tratamientos del muestreo de camas comerciales, sí se lograron observar patrones diferenciales para cada uno de los aditivos dietarios.

Los sucesivos ciclos de reutilización de la cama podrían mostrar diferencias, no sólo en la composición microbiana sino también en su composición química, afectando de esta forma la estructura de las comunidades microbianas allí presentes.

La acumulación de excretas en la cama podría funcionar como un disturbio que alteraría el ambiente generando, a lo largo del tiempo, un ciclo de sucesiones ecológicas, seleccionando aquellas bacterias capaces de sobrevivir en las nuevas condiciones generadas. Esto concuerda con estudios realizados sobre el efecto del pH, humedad, salinidad y contenidos de nutrientes como C y N, en la composición de las comunidades de cama de pollo (Cressman *et al.*, 2010; Dumas *et al.*, 2011).

Algunos autores compararon la microbiota presente en camas nuevas, que se utilizaron sólo en un ciclo productivo, con aquellas que habían sido reutilizadas y encontraron importantes diferencias en las comunidades, con pérdidas de riqueza y diversidad a medida que los ciclos sucedían (Cressman *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016), sugiriendo que el manejo de las camas afecta su composición.

Nuestros resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la diversidad de Shannon y equitatividad de Pielou entre las muestras de cama y las de ciego, pero no se observaron diferencias entre la riqueza de las mismas. El hecho de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre la riqueza de las muestras de cama y las muestras de ciego podría explicarse por el uso de cama nueva en el galpón, hipotetizando que la riqueza de las mismas se modificará conforme pasen los ciclos productivos, disminuyendo la cantidad de bacterias ambientales y seleccionándose aquellas de origen intestinal, hasta encontrarse valores de riqueza significativamente menores en las camas que en los ciegos (Wang *et al.*, 2016).

Las muestras de cama mostraron un core taxonómico compuesto por 29 taxa, 19 de ellos no estuvieron presentes en ninguna muestra de ciego, por lo que podríamos decir que dichas bacterias no son habitantes típicas del tracto gastrointestinal de las aves. Dentro de este grupo encontramos a las familias Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Micrococcaceae, Familia del orden Micrococcales no clasificada, Nocardiosaceae, Familia no clasificada del Orden III de Bacteroidetes Incertae Sedis, Chitinophagaceae, Sphingobacteriaceae, Trueperaceae, Planococcaceae, Aerococcaceae, Eubacteriaceae, Familia del Orden Bradymonadales no clasificada, Alcanivoracaceae, Halomonadaceae y Xanthomonadaceae. Estas bacterias, probablemente,

deriven de los materiales originarios de la cama o fueron adquiridas durante el ciclo de crecimiento, introducidas por los productores o maquinaria utilizada.

Muchas de estas familias están descritas en la bibliografía como ampliamente distribuidas en diferentes ambientes, entre ellos suelo, agua, piel de diferentes animales, productos alimenticios, así como también, en ambientes salinos e hipersalinos incluyendo agua de mar. Es interesante destacar que la cama de pollo, dada la acumulación de excretas, presenta una alta conductividad eléctrica (CE). La CE es una medida que permite evaluar la concentración de sales solubles presentes en una solución. El valor promedio de CE de las camas de pollo es de  $>10 \text{ dS.cm}^{-1}$  (Almada et al., 2016). Para tener algún dato de referencia, puede mencionarse que en los suelos agrícolas se recomiendan valores de CE bajas, en lo posible menos de  $1 \text{ dS.cm}^{-1}$ , ya que facilita el manejo de la fertilización y se evitan problemas de fitotoxicidad en los cultivos. Como se mencionó anteriormente, muchas de las bacterias encontradas en la cama presentan tolerancia a la salinidad como ser Dietziaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Micrococcaceae, Nocardiosaceae y Halomonadaceae, pudiendo esto responder a la elevada CE típica de las muestras de cama de pollo.

Otro grupo de estas bacterias presentes en las camas, están descritas como posibles patógenas vegetales y/o animales como ser las pertenecientes a las familias Corynebacteriaceae, Sphingobacteriaceae o Xanthomonadaceae. La presencia de estas bacterias tiene un gran impacto desde el punto de vista agronómico, no sólo por la posibilidad de infecciones en las aves durante los sucesivos ciclos productivos, sino también, dado que la cama suele utilizarse luego como un fertilizante orgánico en suelos agrícolas, y de no ser tratada correctamente, podrían distribuirse estas bacterias en el

ambiente, produciendo contaminación de suelos y cursos de agua cercanos, poniendo en riesgo la salud animal y vegetal fuera del galpón de producción aviar.

Es importante destacar que no se encontraron patógenos de importancia como *Salmonella* o *Clostridium* en ninguna de las muestras analizadas. Otros trabajos realizados sobre cama de pollos, tampoco encontraron estos patógenos en muestras de cama, ya sean muestras de cama fresca o reutilizada (Wang *et al.*, 2016). Por su parte, *Campylobacter* fue detectado sólo en algunas muestras con abundancias relativas muy bajas (CON: presente en  $\frac{2}{3}$  muestras con  $0,0054 \pm 0,0059\%$ , BAC: presente en  $\frac{2}{3}$  muestras con  $0,096 \pm 0,162\%$ , TAN: presente en  $\frac{1}{3}$  muestras con  $0,0033 \pm 0,0057\%$ ). Sin embargo, futuros estudios utilizando otras herramientas, como qPCR o cultivos selectivos, son necesarios para determinar la prevalencia y abundancia de estos patógenos entéricos.

Finalmente, es importante destacar, que todas estas familias presentes en las camas, excepto una no clasificada perteneciente al orden Bradymonadales, fueron encontradas también en los muestreos de camas comerciales, por lo que las mismas parecerían ser competitivas y tolerar los ciclos sucesivos de crecimiento.

Por otro lado, se encontraron 10 taxa que además de formar parte del core taxonómico de las camas fueron encontradas en al menos una muestra de ciego. Las mismas fueron: Dermabacteraceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Familia XI del orden Clostridiales, Alcaligenaceae y Pseudomonadaceae.

Estos taxa representan miembros típicos del tracto gastrointestinal de animales, como Staphylococcaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae o la Familia XI del orden Clostridiales; o bacterias ampliamente distribuidas en la naturaleza como Bacillaceae, Alcaligenaceae o Pseudomonadaceae.

Además, 4 familias presentes en las camas fueron encontradas en todas las muestras de ciegos, siendo las mismas típicas bacterias del tracto gastrointestinal de aves como Bacteroidaceae, Flavobacteriaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. En la mayoría de los animales de sangre caliente, los dos filos que presentan mayores proporciones en el TGI son los Firmicutes y los Bacteroidetes (Kollarcikova *et al.*, 2020). Particularmente, en los ciegos de pollos estos filos se encuentran en proporciones similares de alrededor del 45% cada uno (Rychlik, 2020).

Los firmicutes degradan preferentemente oligosacáridos o fermentan subproductos metabólicos como el lactato o el acetato obteniendo butirato; mientras que los bacteroidetes suelen degradar polisacáridos complejos y producir acetato, propionato y succinato (Kollarcikova *et al.*, 2020).

Entre las familias más comunes pertenecientes al filo Firmicutes se encuentran Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, seguidas por Lactobacillaceae, Veillonellaceae y Erysipelotrichaceae. Lachnospiraceae y Ruminococcaceae son formadoras de esporas y representan los principales productores de butirato a partir de la fermentación de carbohidratos, convirtiendo dos moléculas de acetyl-CoA en crotonil-CoA. Las bacterias pertenecientes a estas dos familias son muy sensibles al oxígeno y se encuentran entre las primeras en desaparecer de la microbiota intestinal durante enfermedades inflamatorias debido a la producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos y granulocitos (Rychlik, 2020).

Pertenecientes al filo Bacteroidetes, las principales familias que se encuentran en el TGI de pollos son Rikenellaceae, Bacteroidaceae, Prevotellaceae y Porphyromonadaceae. Los representantes de todas estas familias producen propionato a partir de succinato. Los genomas de Bacteroidaceae están enriquecidos con genes implicados en la degradación de

polisacáridos complejos y su metabolismo produce acetato, propionato o succinato (Rychlik, 2020).

Por su parte, la familia Flavobacteriaceae está ampliamente distribuida en entornos naturales incluidos material vegetal, suelo y agua. Algunas bacterias pertenecientes a esta familia pueden causar deterioro en los alimentos y productos alimenticios derivados de la producción aviar, ya sea que las mismas tengan su origen en las aves de producción o en el ambiente de la planta de faena (de Beer *et al.*, 2005).

### **4.3.2 Camas de pollo provenientes del Ensayo 3**

Al comparar las muestras de camas que provenían del ensayo 2 con las provenientes de los muestreos de las granjas, nueve familias conformaron un core taxonómico que fue compartido por ambos grupos de muestras. Estas familias fueron: Corynebacteriaceae, Sphingobacteriaceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Ruminococcaceae y Alcaligenaceae, que como se dijo anteriormente son miembros típicos del TGI de las aves o bacterias ubicuas ambientales.

Las muestras provenientes de los muestreos de granjas productivas, permitieron observar diferencias entre los tratamientos con antibiótico o polifenoles evaluados.

Se encontraron diferencias en la clase Flavobacteriia perteneciente al filo Bacteroides, en los órdenes Xanthomonadales y Flavobacteriales, en la familia Xanthomonadaceae y en el género *Moheibacter*.

Las flavobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, pudiendo encontrarse tanto en el suelo, ambientes acuáticos, plantas e intestino de los animales. Algunas flavobacterias promueven la protección y crecimiento de las plantas. Las

flavobacterias terrestres están muy adaptadas al metabolismo de los carbohidratos de las plantas, lo que parece ser la clave de la detección enriquecida de estas bacterias en la filósfera y rizósfera de las plantas (Kolton *et al.*, 2013). Dentro de esta familia encontramos el género *Moheibacter* que comprende bacterias productoras de oxidasas y catalasas lo que podría ser beneficioso a la hora de compostar los residuos de la producción avícola. Estas bacterias podrían metabolizar sinérgicamente diferentes fuentes de carbono en la etapa de maduración, logrando mejorar la calidad del compost obtenido (Mao *et al.*, 2020).

Por su parte, el orden Xanthomonadales comprende bacterias que son fitopatógenas de importancia en agricultura, como las del género *Xanthomonas* y *Xylella*. Algunas de las bacterias de este grupo también son patógenas humanas, como *Stenotrophomonas*, patógeno oportunista multirresistente (Looney *et al.*, 2009).

## 5 Conclusiones

Los resultados de este trabajo indican que los taninos y la bacitracina mostraron un patrón diferencial en la modulación de la microbiota cecal de pollos. A su vez dicha modulación mostró patrones diferentes en los ambientes experimentales y comerciales, aunque lograron encontrarse modulaciones equivalentes en parte de los taxa evaluados.

En el ensayo experimental se observó un incremento en la relación F/B en los animales alimentados con TAN y esto podría deberse al incremento de bacterias pertenecientes al orden Clostridiales. La abundancia de diferentes miembros de este orden ha sido relacionada con una mejora en la salud intestinal de las aves y una mejor eficiencia energética, sugiriendo que este taxón podría estar asociado con mejoras en el crecimiento.

Tanto en los ensayos experimentales como en los comerciales, el tratamiento con TAN mostró una mayor proporción de este orden en su composición microbiana.

De cualquier manera, los mecanismos por los cuales los taninos modulan la microbiota intestinal de las aves son aún desconocidos y futuras investigaciones debieran realizarse para comprender este fenómeno de modulación, incluyendo perfiles de SCFAs que permitan correlacionar los mismos con la composición microbiana.

Por otro lado, el análisis de la microbiota presente en la cama de pollos nos permitió caracterizar las bacterias de ambientes comerciales, encontrando que la comunidad de bacterias típicas de camas de pollo cuenta con la presencia no sólo de bacterias del TGI de aves, sino también con bacterias patógenas -tanto animales como vegetales- y bacterias ambientales provenientes del material utilizado como sustrato.

Las características fisicoquímicas de la cama, como ser el pH o la CE, modulan también el tipo de bacterias presentes en el galpón, observándose la presencia de bacterias con tolerancia a la salinidad.

Esta información toma relevancia al considerar que la cama es reutilizada en los galpones comerciales durante un año, es decir, durante cinco o seis ciclos productivos, y entonces las bacterias presentes en la cama de pollo funcionarán como inóculo para los pollitos que ingresen al galpón en el ciclo siguiente, determinando la microbiota presente en su TGI.

Así mismo, las bacterias de la cama pueden ser diseminadas al ambiente cuando la misma es utilizada como fertilizante orgánico en producciones agrícolas al momento de su reemplazo (de forma anual), principalmente si no se toman las precauciones correspondientes o no se realizan los tratamientos de este residuo de forma adecuada.

Es importante destacar el alcance del relevamiento de las granjas comerciales realizado en este capítulo de la tesis. No sólo se logró caracterizar las bacterias presentes en los ciegos de las aves y en las camas de los galpones comerciales, describiendo una realidad productiva que en muchos casos no se logra alcanzar con ensayos controlados; sino que además, este tipo de estudios no son comunes ya que requieren la participación de las granjas, muchas veces reacias a este tipo de colaboraciones, y la utilización de aditivos dietarios alternativos a gran escala, que ponen en riesgo tanto la productividad como las ganancias comerciales de las empresas.

Asimismo, los futuros cambios en la legislación de la Unión Europea con su cláusula de reciprocidad, impone un gran desafío para el sector. Es importante destacar el avance realizado en los últimos años, contando ya con granjas que trabajan libres de antibióticos y comprenden el riesgo que implica la generación de resistencia antimicrobiana, no sólo por el impacto en el mercado internacional sino por sus efectos en la salud.

## Capítulo 3

# Los residuos avícolas como enmiendas orgánicas

*Toda verdad es simple... ¿No es eso una doble mentira?*

Friedrich Nietzsche

1844-1900, Alemania

## 1 Introducción

### 1.1 Impacto ambiental

Los microorganismos presentes en los suelos juegan un rol fundamental ya que se ven involucrados en algunas de las principales funciones que éste cumple. Estos microorganismos participan tanto en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, en procesos como la biorremediación, o promoviendo la salud y el crecimiento de las plantas a través de ciertas especies bacterianas. Por ejemplo, muchas de estas bacterias colonizan la rizósfera de las plantas y permiten la supresión de enfermedades mediante una amplia gama de mecanismos de control biológico, como la competencia por nutrientes o nichos en la raíz, la producción de aleloquímicos inhibidores del crecimiento de los patógenos y la inducción de resistencia local o sistémica en las plantas huésped (Simonetti *et al.*, 2015).

La estructura de la comunidad bacteriana del suelo es sensible a los cambios ambientales producidos por acción natural o por las actividades humanas y, por esta razón, podría usarse como indicador del impacto ambiental de las prácticas agrícolas (Yin *et al.*, 2010). Las alteraciones que se producen en la calidad del suelo, usualmente vienen acompañadas de cambios en la estructura de la comunidad bacteriana asociada a ese suelo (Kennedy y Smith, 1995). De hecho, la pérdida de diversidad microbiana y los cambios en la composición de la estructura de las comunidades, son una de las principales consecuencias que tiene la fertilización química (Coolon *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Por lo tanto, mantener altos niveles de diversidad microbiana en el suelo es de crucial importancia para la agricultura sustentable (Bhat, 2013; Kennedy y Smith, 1995).

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de estrategias y enfoques para una producción agrícola sustentable (Diacono y Montemurro, 2010; Pretty y Bharucha, 2014). En particular, las enmiendas orgánicas aparecen como una alternativa adecuada al uso excesivo de fertilizantes inorgánicos (Fließbach *et al.*, 2007).

En este sentido, la intensificación de los sistemas productivos avícolas revela no sólo la necesidad de desarrollar e implementar nuevas tecnologías y prácticas de manejo, sino de desarrollar un tratamiento adecuado de los residuos pecuarios para lograr un desarrollo sustentable de la actividad.

El guano de ponedoras y la cama de pollo son los principales residuos de la producción aviar. Tradicionalmente, ambos se han utilizado como fertilizantes y/o acondicionador del suelo, ya que son ricos en nutrientes imprescindibles para el crecimiento vegetal, presentando macronutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), y micronutrientes como zinc (Zn) y cobre (Cu). Además, estas enmiendas pueden ser muy beneficiosas para la calidad del suelo agrícola, ya que aumentan el contenido de materia orgánica (MO) del suelo, mejoran sus propiedades físicas -como la porosidad, la aireación, la capacidad de retención hídrica, etc.-, aumentan la estabilidad estructural, reducen la erosión, mejoran la disponibilidad de nutrientes (reduciendo así los costos de fertilización) y estimulan la actividad microbiana y la biomasa del mismo (Das *et al.*, 2017; Evanylo *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2016).

Si bien por las características aquí mencionadas, tanto la cama de pollo como el guano pueden considerarse como algunos de los mejores fertilizantes orgánicos disponibles, el manejo inadecuado de los mismos puede presentar un peligro potencial de contaminación, generando un impacto negativo en el ambiente, contribuyendo a contaminaciones del suelo, agua y aire.

Históricamente, la forma habitual de utilización de las excretas avícolas fue a través de la aplicación directa en lotes agrícolas, como fertilizante para el suelo. Actualmente, esta no es una práctica agronómica recomendada dados los riesgos de contaminación que acarrea. Los principales inconvenientes asociados al manejo inadecuado de estos residuos son la lixiviación de los nitratos que pueden alcanzar las aguas subterráneas, la escorrentía que puede aportar fósforo a cursos de agua superficial y la incorporación al ambiente de microorganismos patógenos presentes en los residuos, así como también el aporte de metales, hormonas, antibióticos, antiprotozoarios, entre otros (Pizarro *et al.*, 2019; Rizzo *et al.*, 2020; Sepulcri *et al.*, 2018).

Por ejemplo, el exceso de nutrientes, principalmente fósforo, puede inducir la proliferación de algas y el crecimiento de cianobacterias, generando condiciones asociadas de hipoxia/anoxia en la columna de agua, así como altos niveles de amoníaco, que pueden matar a los animales acuáticos (Hu *et al.*, 2017).

Algunos autores, además, han informado la detección de toxicidad aguda en varios organismos terrestres que habían sido expuestos a residuos crudos de la producción animal. En este sentido, los índices de fitotoxicidad pueden usarse como una herramienta que permite evaluar la toxicidad de muestras complejas e implementarse en estrategias de monitoreo como herramientas ecotoxicológicas útiles (Young *et al.*, 2016).

Estos residuos de la producción animal no sólo afectan negativamente la calidad del aire, las aguas superficiales, el suelo y las aguas subterráneas, sino que también representan riesgos para la salud pública por la exposición a los mismos (Hu *et al.*, 2017). El enfoque de “One Health” o “Una salud” reconoce que los seres humanos, los animales y la salud ambiental están estrechamente relacionados y, por lo tanto, el camino a seguir para abordar

problemas interdisciplinarios complejos debe considerarse en los tres sectores (van Bruggen *et al.*, 2019).

Es por eso que uno de los principales objetivos en el tratamiento de estos residuos es obtener un producto de uso seguro para el ambiente, es decir que sufra una disminución de las posibles cargas de contaminantes (gases de efecto invernadero, exceso de nutrientes, metales pesados, restos de medicamentos y parásitos), agregando valor a los desechos de la producción y permitiendo aprovechar y recuperar los nutrientes que contienen para satisfacer una importante demanda de los suelos.

## **1.2 Procesos de biotransformación de residuos**

Los procesos que se abordaron en este trabajo para la biotransformación de los residuos avícolas fueron el compostaje y la digestión anaeróbica. Estos tratamientos permiten la obtención de un producto final que puede utilizarse como enmienda orgánica.

### **1.2.1 Compostaje**

El compostaje es un proceso aeróbico realizado por microorganismos que transforman desechos orgánicos sólidos en un material seguro y biológicamente estable, que puede devolverse al ambiente (Román *et al.*, 2013).

Es una técnica aprobada, muy difundida y sencilla, lo que la convierte en una herramienta de fácil adopción para los productores. Las principales ventajas del compostaje son la reducción en volumen del residuo (25-30 % en el caso de la cama), la disminución de la humedad (hasta 50 % en el guano), la estabilización química del material, la disminución progresiva de olores y moscas, y la posibilidad de eliminar semillas de malezas y algunos

patógenos, si las temperaturas internas necesarias de la pila son alcanzadas y mantenidas por algunos días. Entre las desventajas encontramos la liberación de amoníaco que, en los primeros estadíos, puede ser importante y generar olores desagradables y disminución del valor fertilizante de la enmienda, y la liberación de dióxido de carbono a la atmósfera que reduce el contenido de materia orgánica del compost (Maisonnave *et al.*, 2015).

El proceso de compostaje se puede dividir en dos fases principales: la fase activa (que consta de las etapas mesófila (25-40°C), termófila (40-65°C) y de enfriamiento) y la fase de curado o fase de maduración.

Durante la fase activa, los materiales biodegradables se descomponen, transforman y parcialmente mineralizan como consecuencia de la intensa actividad microbiana. Los compuestos fácilmente degradables como los azúcares, son degradados por microorganismos mesófilos, entre los que encontramos representantes de las familias: Alcaligenaceae, Alteromonadaceae, Bacillaceae, Burkholderiaceae, Bradyrhizobiaceae, Caryophanaceae, Caulobacteraceae, Cellulomonadaceae, Clostridiaceae, Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Flexibacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Intrasporangiaceae, Methylobacteriaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Neisseriaceae, Nitrosomonadaceae, Nocardiosaceae, Paenibacillaceae, Phyllobacteriaceae, Propionibacteriaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhodobacteraceae, Sphingobacteriaceae, Staphylococcaceae y Xanthomonadaceae. (Partanen *et al.*, 2010). Algunos de los géneros más importantes en esta etapa son *Lactobacillus* y *Bacillus*. La actividad metabólica de estos microorganismos produce calor, por lo que se comienza a observar un aumento de la temperatura.

A medida que la temperatura aumenta a unos 40 °C, los microorganismos termófilos compiten con los mesófilos por la degradación de las sustancias restantes. Algunas bacterias mesófilas, como las del género *Bacillus*, sobreviven a estas condiciones debido a la formación de endosporas. Otros géneros tienen la capacidad de engrosar su pared celular o formar una capsula exterior, sirviendo de protección a las condiciones adversas. Las bacterias termófilas como *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Thermus* e *Hydrogenobacter* se hacen cargo de la degradación y se convierten en los grupos dominantes en la comunidad microbiana. *Actinobacteria* y *Bacillus* se han descrito como indicadores del buen funcionamiento del compostaje (Partanen *et al.*, 2010). Las actinobacterias han sido reportadas como un grupo crítico en el proceso de compostaje ya que pueden utilizar una amplia gama de fuentes de carbono como celulosa, lignina y proteínas. Algunas especies de *Actinobacteria* son termotolerantes y pueden permanecer activas a temperaturas de hasta 60 °C. La descomposición continúa en esta etapa degradando fuentes más complejas de C, como la lignina y la celulosa, y se alcanzan temperaturas de aproximadamente 62-65 °C. Estos microorganismos actúan también transformando el N en NH<sub>3</sub>, por lo que el pH se vuelve alcalino.

Esta fase también recibe el nombre de fase de higienización ya que el calor generado elimina bacterias de origen fecal como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, así como también quistes y huevos de helmintos, esporas de hongos fitopatógenos y semillas de malezas que pueden encontrarse en el material de partida (Román *et al.*, 2013).

La duración de cada fase dependerá de las características de los residuos orgánicos que se están compostando, así como también del sistema de oxigenación de las pilas (sistema de volteos, ventilación forzada, etc.), entre otros. Cuando una correcta aireación es

realizada, la fase termófila continúa hasta el agotamiento de los compuestos metabolizables, cuando el calor producido es inferior a la disipación del mismo.

Una vez que se agotan las sustancias degradables, el número de microorganismos termófilos disminuye, mientras que la temperatura comienza a bajar. En esta etapa, los microorganismos mesófilos que permanecieron inactivos en la etapa anterior y que resistieron las altas temperaturas, vuelven a estar metabólicamente activos. La riqueza y diversidad de bacterias presentes en esta nueva etapa, dependerá del número de especies previas con capacidad de formar endosporas o cápsulas.

La actividad metabólica de las bacterias mesófilas se incrementa. Las mismas tienen la capacidad de degradar sustratos difíciles como la hemicelulosa y la celulosa, de oxidar y mineralizar nitrógeno inorgánico y compuestos azufrados, de formar compuestos húmicos, de fijar nitrógeno atmosférico, generar supresión de fitopatógenos, etc.

Por su parte, la fase de maduración se caracteriza por la conversión de una parte de la materia orgánica estabilizada, en una matriz de nutrientes y materia orgánica similar al humus, denominada "compost maduro". En esta fase de maduración final, los compuestos recalcitrantes (por ejemplo, complejos de lignina-humus) se vuelven predominantes. Los parámetros físico-químicos se estabilizan, es decir que ya no sufren cambios, y el compost se considera maduro (Yu, 2014).

La mayoría de los microorganismos patógenos de plantas y animales son mesófilos y se eliminan eficazmente a las temperaturas adecuadas de compostaje; sin embargo, si el proceso de compostaje no se desarrolla de manera óptima y las temperaturas no aumentan espontáneamente, existe el riesgo de que los patógenos sobrevivan. La presencia de estos microorganismos en el producto final indicaría un compostaje insuficiente y, posteriormente, podría representar una amenaza potencial para los usuarios del compost.

El nitrógeno es uno de los elementos clave en el proceso de compostaje, ya que puede tener efectos valiosos pero también dañinos en el proceso. La dinámica del N durante el proceso de compostaje comprende la amonificación, nitrificación y desnitrificación, inmovilización y liberación de N a través de lixiviados y gases de escape (Yu, 2014).

Durante el proceso de amonificación, las proteínas se degradan, los aminoácidos se desaminan y finalmente se forman amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) a un pH y temperatura elevados. La conversión de  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ , conocida como nitrificación, es un proceso de oxidación de dos pasos que se lleva a cabo principalmente por bacterias oxidantes del amoníaco (como *Nitrosomonas*) y bacterias oxidantes de nitritos (como *Nitrobacter*).

La desnitrificación es la reducción microbiana de  $\text{NO}_3^-$  a través de  $\text{NO}_2^-$  a productos gaseosos como  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  bajo condiciones limitadas de oxígeno por bacterias anaeróbicas facultativas. Las temperaturas óptimas para la nitrificación y desnitrificación se encuentran dentro del rango mesófilo de 15 a 30 °C, con valores de pH óptimos de 6 a 8,5 y, por lo tanto, ocurren típicamente en la fase de maduración del compostaje (Yu, 2014).

La inmovilización convierte los compuestos de N inorgánicos (por ejemplo,  $\text{NH}_4^+$ ) en compuestos de N orgánicos (como proteínas). Los compuestos de nitrógeno gaseoso que se forman durante la amonificación y desnitrificación se liberan principalmente a través de la aireación durante el compostaje. Otros compuestos de N solubles en agua se liberan a través de lixiviados (Körner y Stegmann, 2002).

El proceso de compostaje impulsado por microorganismos está influenciado por las proporciones de materiales carbonados y nitrogenados presentes en la materia prima del compostaje. Los microorganismos necesitan carbono para crecer y nitrógeno para la síntesis de proteínas. Una relación C/N inicial alta provoca un inicio lento del proceso de

compostaje, mientras que una relación baja da como resultado un alto nivel de emisión de amoníaco (Tiquia y Tam, 2000). Se recomienda una proporción C/N de alrededor de 30 como la óptima para el compostaje rápido (Kumar, 2011). Durante el compostaje eficiente, se espera que la relación C/N disminuya como consecuencia de la degradación de la materia orgánica y la mineralización (Yu, 2014). En el caso particular del guano de gallina es imprescindible la utilización de una fuente de carbono adicional para reducir la humedad inicial, agregar porosidad que permita la circulación de aire y lograr una relación C/N en rangos de 25-30:1 en el sustrato inicial.

### **1.2.2 Digestión Anaeróbica**

En la digestión anaeróbica, los compuestos orgánicos son degradados por microorganismos anaeróbicos produciendo biogás, como metano y dióxido de carbono, varios gases traza (como amoníaco o sulfuro de hidrógeno) y calor en ausencia de oxígeno (Kymäläinen *et al.*, 2012). El biogás generado es considerado un buen combustible que puede ser utilizado para la combustión y generación de calor y/o energía eléctrica, por lo que esta metodología se considera una alternativa importante en la obtención de energías renovables, dada la disminución del suministro de combustibles fósiles y las preocupaciones sobre el aumento en la concentración de gases de efecto invernadero. Por su parte, la obtención de un producto final tipo lodo estabilizado, permite su utilización como fertilizante o enmienda de suelo (Yu, 2014).

Los reactores de digestión anaeróbica operan comúnmente a temperaturas mesófilas (30-40 °C) y termófilas (50-60 °C), pudiendo distinguirse cuatro etapas en el proceso: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Las bacterias son dominantes en la digestión anaeróbica, comprendiendo hasta el 80% de la diversidad microbiana total (Krause *et al.*, 2008). Los filos comúnmente detectados incluyen a los Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospira, Thermotogae, Fusiobacteria, Spirochaetes y Deferribacteres, mientras que los representantes de las arqueas pertenecen en su mayoría al filo Euryarchaeota, que incluye todos los metanógenos conocidos (Yu, 2014).

Los grupos bacterianos son responsables de la producción de acetato de hidrógeno y dióxido de carbono en las tres primeras etapas, mientras que en la última etapa las arqueas metanogénicas producen metano a partir de acetato o, alternativamente, de hidrógeno y dióxido de carbono (Ritari *et al.*, 2012).

La hidrólisis es uno de los procesos enzimáticos más importantes que determinan la eficiencia de la digestión anaeróbica. En esta etapa, los biopolímeros (polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) se despolimerizan e hidrolizan en compuestos monoméricos (azúcares, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos). Una comunidad compleja de bacterias y hongos hidrolíticos anaeróbicos se encarga de la degradación produciendo enzimas hidrolíticas extracelulares como celulasas y xilanasas y disgrega los biopolímeros complejos en sus unidades estructurales. Las bacterias y hongos involucrados en esta etapa consisten en subgrupos de Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes (por ejemplo, *Clostridium* y *Bacillus*) y *Neocallimastix* (Insam *et al.*, 2010).

El paso de hidrólisis es seguido por el paso de acidogénesis, también conocido como paso de fermentación. Aquí, los compuestos monoméricos se convierten en productos intermedios como alcoholes, ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono e hidrógeno molecular. Las bacterias son responsables de la mayoría de las reacciones fermentativas; los géneros reportados incluyen *Lactobacillus* y *Clostridium*. Posteriormente, los productos

de fermentación se oxidan en acetato, formiato, hidrógeno y dióxido de carbono principalmente por bacterias acetogénicas (por ejemplo, Firmicutes) (Yu, 2014).

La metanogénesis es la última etapa de la digestión anaeróbica, donde finalmente se genera metano, y se lleva a cabo mediante arqueas metanogénicas (Coats *et al.*, 2012). De los cinco órdenes de arqueas metanogénicas (Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanopyrales), sólo los cuatro primeros son dominantes en la digestión anaeróbica (Insam *et al.*, 2010; Yu, 2014).

Algunas limitaciones de esta tecnología son la necesidad de disponer de tierras agrícolas para aplicar el digestato (porción líquida del remanente); la conversión de nitrógeno orgánico en amoniacal, que aumenta las pérdidas potenciales de nitrógeno durante la aplicación a campo; y la disponibilidad de una red de energía para poder vender los excedentes energéticos.

### 1.3 Hipótesis

A partir de esta información hipotetizamos que la aplicación de residuos avícolas crudos en suelos agrícolas producirá un disturbio diferencial en la estructura de su comunidad bacteriana, que dependerá del tipo de residuo utilizado. A su vez, el impacto generado por estos residuos disminuirá al realizar un tratamiento de los mismos, permitiendo la obtención de enmiendas seguras.

Para probar estas hipótesis, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos y ecotoxicológicos de los residuos, crudos y tratados, y del suelo, así como también la composición de las comunidades bacterianas de las muestras antes descritas, con el objetivo de:

- Caracterizar residuos avícolas crudos y tratados, a escala experimental;
- Evaluar el efecto de la aplicación de residuos avícolas crudos sobre suelos agrícolas

## **2 Materiales y métodos**

### **2.1 Residuos crudos**

El guano de ponedoras (M) y la cama de pollo (L) fueron colectados de dos granjas con 20.000 y 30.000 aves respectivamente, ubicadas en la localidad de Crespo, Entre Ríos, Argentina.

Las muestras fueron colectadas por triplicado para cada tipo de residuo. Para lograr muestras representativas de la variabilidad espacial del galpón, las muestras correspondientes al guano de ponedoras fueron obtenidas a partir de submuestreos realizados en tres áreas y profundidades diferentes de las pirámides de guano ubicadas debajo de las jaulas de las gallinas ponedoras.

La cama de pollo muestreada estaba conformada por cáscara de arroz y, de forma similar a las muestras de guano, estas muestras consistieron en un conjunto de submuestras colectadas de la periferia y centro de una pila de cama de pollo, que se encontraba fuera del galpón de producción y que había sido utilizada en tres ciclos productivos de crecimiento aviar.

### **2.2 Efectos de la aplicación de residuos avícolas sobre suelos agrícolas**

El muestreo de campo se realizó en Crespo, Entre Ríos, Argentina; donde se eligieron lotes con características edáficas equivalentes, en los que se realizaban aplicaciones de residuos avícolas como enmiendas orgánicas. La región tiene un clima subhúmedo (precipitación anual  $\approx 1000$  mm) y un clima templado (temperatura anual  $\approx 18,3$  °C). El suelo pertenece a los Argiudoles vérticos de la Serie Crespo. La textura del horizonte A corresponde a franco arcillo limosa con 354 y 614 g Kg<sup>-1</sup> de arcilla y limo, respectivamente (Plan Mapa de

Suelos, 1998). Adicionalmente, los ciclos productivos realizados en los lotes seleccionados fueron similares y característicos de la zona de producción agrícola, encontrándose rotaciones de trigo / soja - maíz.

Este muestreo de suelo involucró tres tratamientos con tres repeticiones cada uno: (1) parcela con suelo control, es decir suelo sin enmiendas agregadas (SC); (2) parcela con suelo + guano de ponedoras (10 Tn/ha/año) (SM); (3) parcela con suelo + cama de pollos (6 Tn/ha/año) (SL). Para los casos 2 y 3, las aplicaciones de los residuos avícolas fueron realizadas de forma intermitente, durante los últimos 10 años, alternando año a año entre la aplicación de un residuo avícola (guano o cama de pollo) y fertilización inorgánica de nitrógeno (150 Kg ha<sup>-1</sup> urea en promedio). La última aplicación de residuo avícola se había realizado una semana antes de la siembra de maíz (*Zea mays*), siguiendo las prácticas de manejo típicas de la región.

Las muestras de suelo fueron colectadas en el estadio V3, o tercera hoja, del maíz en Octubre de 2018. Las mismas se tomaron por triplicado, a una profundidad de 0-10 cm, utilizando para la formación de cada muestra, 10 posiciones diferentes por parcela mediante barreno de 5 cm de diámetro. Para evitar la contaminación, el barreno se limpió con alcohol etílico al 70 % y se enjuagó completamente con agua estéril después de la toma de muestras de cada parcela.

Luego, cada muestra se dividió en dos partes: una se almacenó a 4 °C para el análisis fisicoquímico y la otra se almacenó a -80 °C para la extracción de ADN.

## **2.3 Residuos tratados**

Se recolectó guano en una granja automatizada de gallinas ponedoras ubicada en la localidad de Hurlingham, Buenos Aires. Al mismo se le descartaron plumas y partículas gruesas e inorgánicas como piedras. Se fraccionó la muestra para realizar tres tratamientos: guano crudo, guano compostado y guano digerido anaeróbicamente.

### **2.3.1 Guano crudo**

Se tomaron seis muestras del guano, tres para el análisis fisicoquímico, que se guardaron a 4 °C hasta su utilización, y tres fueron utilizadas para el análisis de las comunidades microbianas. Estas últimas se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

### **2.3.2. Guano compostado**

Tres pilas de compostaje de 2 m<sup>3</sup> (1.5m x 1.5m x 1m) fueron armadas mezclando guano de ponedoras (40%), marlo (20%), aserrín (20%) y viruta de madera (20%) (C:N inicial = 23.5 ± 5.7% y un contenido de humedad 72.4 ± 1.6%) en un campo experimental del Laboratorio de Tratamientos de Residuos (LTR) del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham, Argentina. Las pilas se voltearon manualmente cada 3 días durante la primera fase de descomposición activa del proceso y cada 5 días cuando la temperatura interna de la pila alcanzó la temperatura ambiente (etapa de maduración). El contenido de humedad se mantuvo mediante riego y teniendo en cuenta los aportes de agua de lluvia.

Cada pila de compostaje fue considerada una unidad experimental (n = 3 pilas). El muestreo se realizó a los 83 días tomando tres submuestras en ubicaciones diferentes de

cada pila. Éstas fueron homogeneizadas hasta obtener una muestra representativa de aproximadamente 1 Kg, de acuerdo a especificaciones estandarizadas (USDA y USCC, 2001). De allí se tomaron muestras para el análisis fisicoquímico que se mantuvieron a 4 °C, y muestras que se mantuvieron a -80 °C para el análisis de comunidades microbianas.

### **2.3.3. Guano digerido anaeróbicamente**

El digestato utilizado se obtuvo de un reactor anaeróbico de flujo continuo a escala piloto alimentado con el guano de ponedoras (volumen = 20 L), instalado en el LTR IMyZA-INTA Castelar. Las muestras fueron tomadas por triplicado y mantenidas a 4 °C para ser utilizadas para el análisis fisicoquímico, o a -80 °C para los análisis de comunidades microbianas.

## **2.4 Análisis**

### **2.4.1 Análisis de las propiedades fisicoquímicos**

La caracterización fisicoquímica de los residuos avícolas crudos (M y L) se realizó siguiendo métodos estándar (USDA y USCC, 2001). Se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: materia seca (MS), materia orgánica (MO), nitrógeno total Kjeldahl (NT), pH, conductividad eléctrica (CE), N-nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) y N-amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) y fósforo total (PT). La actividad biológica se midió utilizando el índice de respiración estática (IRE) (Iannotti *et al.*, 1993; USDA y USCC, 2001).

Para las muestras de suelos (SC, SM y SL) se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos según métodos estándar (SAGyP y AACS, 2004): MO, MS, NT, pH, CE,  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NH}_4^+$ , PT y fósforo extraíble (Bray-Kurtz I) (Pe) .

Finalmente, para las muestras de residuos tratados se determinaron los mismos parámetros y utilizando las mismas metodologías que las descritas para los residuos crudos, agregando la cuantificación de metales (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pb) utilizando un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) con celda de colisión (Agilent, modelo 7500cx). Los análisis fisicoquímicos de los residuos tratados formaron, también, parte del trabajo de tesis doctoral del Ing. Agr. Pedro Rizzo (Rizzo, 2020).

#### **2.4.2 Ensayo de fitotoxicidad**

Se llevaron a cabo pruebas de toxicidad aguda de los residuos avícolas en semillas de diferentes especies utilizando el protocolo descrito por Young *et al.* (2016). Para ello se prepararon extractos acuosos mezclando una muestra de guano o cama de pollo con agua desionizada (1:10 p/v) para evaluar las sustancias extraíbles en agua presentes en los lixiviados o en las aguas de esorrentía. Se utilizaron semillas no tratadas químicamente de cinco especies como organismos de prueba: lechuga (*Lactuca sativa* variedad “Gallega”), rabanito (*Raphanus sativus* variedad “Puntas blancas”), zapallito (*Cucurbita maxima* variedad “Veronés”), rúcula (*Eruca sativa*) y achicoria (*Cichorium intybus*).

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado con tres tratamientos para cada especie vegetal (n = 15). Los tratamientos consistieron en extractos acuosos de guano de gallinas ponedoras, cama de pollo parrillero y agua desionizada (control negativo), evaluándose cada uno de ellos por triplicado. Diez (*C. maxima*) o quince (*L. sativa*, *R. sativus*, *E. sativa*, *C. intybus*) semillas fueron expuestas a 4 ml de extracto en placas de Petri con papel de filtro (Munktell AB Box 300, SE-790 20 GRYCKSBO,

Suecia) durante 120 h. Se utilizaron un total de 630 semillas en estos experimentos llevados a cabo en condiciones controladas ( $22 \pm 1$  ° C en oscuridad).

Después de la exposición, se registró el número de semillas germinadas y la longitud de la radícula para determinar los porcentajes de inhibición de la germinación de las semillas y de inhibición del alargamiento de la radícula. Además, se calcularon dos índices de fitotoxicidad: índice de crecimiento relativo (RGI; Eq. 1) e índice de germinación (GI; Eq. 2), siguiendo a Alvarenga *et al.* (2007) y Zucconi *et al.* (1981) respectivamente. Los valores de RGI entre 0 y 0,8 se clasifican como inhibición del alargamiento de la radícula (I), los valores  $>0,8$  y  $<1,2$  como efecto no significativo (NSE) y los valores  $> 1,2$  como estimulación del alargamiento de la radícula (S) (Young *et al.*, 2012). Por su parte, se consideraron a los valores de GI inferiores al 80% como indicadores de inhibición (Tiquia *et al.*, 1996).

$$RGI = \frac{RLPS}{RLC} \quad \text{Eq. 1}$$

$$GI (\%) = RGI \times \frac{GSPS}{GSC} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Donde RLPS es la longitud de la radícula al exponer las semillas a los extractos de residuos avícolas (guano o cama), RLC es la longitud de la radícula en el control negativo, GSPS es el número de semillas germinadas al exponerlas a extractos de residuos avícolas (guano o cama) y GSC es el número de semillas germinadas en el control negativo.

### **2.4.3. Análisis de la estructura de las comunidades microbianas**

#### **2.4.3.1 Extracción de ADN**

Todas las muestras se almacenaron a -80 °C para el análisis molecular. Las extracciones de ADN de dichas muestras se realizaron utilizando el kit comercial QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. El ADN se almacenó a -20 °C hasta ser utilizado en la secuenciación. Un total de 24 muestras de ADN (2 residuos avícolas crudos (M y L), 3 muestras de suelo (SC, SM y SL) y 3 muestras de residuos tratados), con 3 réplicas por tratamiento, se utilizaron para el análisis de la comunidad bacteriana basada en el gen ARNr 16S.

#### **2.4.3.2 Amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S y secuenciación por Illumina**

La amplificación por PCR se realizó utilizando Fluidigm Access Array (Fluidigm Corporation, South San Francisco, EE.UU.) en combinación con el kit Roche High Fidelity Fast Start Kit (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo a Lange *et al.* (2014). Para ellos se prepararon 3 µL de master mix para la PCR que contenía 0.5 µL de buffer 10x sin MgCl<sub>2</sub> (Roche High Fidelity Fast Start Kit), 0.9 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µL DMSO, 0.25 µL 20x Access Array Loading Reagent (Fluidigm Corporation, South San Francisco, EE.UU.), 0,1 µL de dNTP 10 mM cada uno (Roche High Fidelity Fast Start Kit), 0,05 µL Fast Start High Fidelity Enzyme Blend (5 U / µL) (Roche High Fidelity Fast Start Kit) y 1 µL de mezcla de cebadores específicos para la región V3-V4 del gen de ARNr 16S (250 nM cada uno, 341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' y 805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

Se agregaron a estos 3  $\mu\text{L}$  de master mix de PCR, 1  $\mu\text{L}$  de ADN y 1  $\mu\text{L}$  de dobles índices (mezcla equimolar 2  $\mu\text{M}$  de índice 1 (i7) e índice 2 (i5)).

La PCR se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). El perfil térmico utilizado fue de 95 °C por 10 min, seguido de 10 ciclos a 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s, 2 ciclos a 95 °C durante 15 s, 80 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s, 8 ciclos a 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 60s, 2 ciclos a 95 °C durante 15 s , 80 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s, 8 ciclos a 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s y un paso de finalización a 72 °C durante 5 min.

Se mezclaron cantidades iguales de cada amplicón de PCR y la mezcla fue purificada utilizando perlas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de la biblioteca combinada se cuantificó usando Qubit y se analizó en Fragment Analyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). La concentración final de la biblioteca se diluyó a 6 pM con ~ 20% de PhiX añadido debido a la baja diversidad de bases. La biblioteca combinada final se secuenció en Illumina MiSeq con un kit de reactivos de secuenciación MiSeq v2 para obtener lecturas pareadas de 250 pb en la Unidad de Genómica (UGB) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina).

#### **2.4.3.3 Análisis de amplicones del gen ARNr 16S.**

Se analizaron por separado los residuos avícolas crudos, las muestras de suelo y los residuos tratados. Las lecturas sin procesar se analizaron con el software QIIME2 (versión

2018.2). El control de calidad y la eliminación de ruido se realizaron utilizando el algoritmo Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) (Callahan *et al.*, 2016). DADA2 utiliza un modelo paramétrico para inferir secuencias biológicas verdaderas a partir de lecturas, elimina quimeras y secuencias de baja calidad. A continuación, las lecturas se desreplican y se infieren las variantes de la secuencia de amplicones (ASV).

Las secuencias representativas se clasificaron utilizando un clasificador naïve Bayes previamente entrenado para la región V3-V4 de la base de datos 99% SILVA v.128.

Los ASVs se alinearon con mafft (Kato *et al.*, 2002) y se colocaron en un árbol filogenético con fasttree (Price *et al.*, 2010). Las métricas de diversidad alfa (ASVs observadas, Faith PD, índice de diversidad de Shannon y uniformidad de Pielou) y los índices de distancia de diversidad beta (Bray Curtis, Jaccard, UniFrac ponderado y UniFrac no ponderado) (Lozupone y Knight, 2005) se calcularon después de que las muestras fueran rarificadas a la máxima profundidad en la que todas las muestras estuvieran representada.

#### **2.4.3.4 Acciones de las secuencias**

Las secuencias sin procesar del gen ARNr 16S que se utilizaron en este capítulo de la tesis han sido depositadas en el Short Read Archive del NCBI y están disponibles allí con los números de acceso PRJNA689563 y PRJNA741529.

#### **2.4.4. Análisis estadístico**

Los parámetros fisicoquímicos se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se utilizó la prueba de Tukey cuando se observaron diferencias entre medias ( $p < 0,05$ ). Los datos se procesaron en el software InfoStat (InfoStat/L 2008) (Di Rienzo *et al.*,

2016). De manera similar, para los parámetros ecotoxicológicos, se utilizó ANOVA para probar las diferencias entre el guano y la cama de pollos para cada especie de semilla evaluada.

El análisis microbiano se complementó con un análisis de composición de microbiomas (ANCOM) realizado en diferentes niveles taxonómicos para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de cualquier taxón entre tratamientos (Mandal *et al.*, 2015). Los resultados se expresaron utilizando la distribución empírica de W de los análisis de grupos y los resultados se representaron como un diagrama de volcán (volcano plot).

Los análisis estadísticos para matrices de distancia de diversidad alfa y beta se completaron utilizando QIIME2. Se graficaron los índices de alfa diversidad en diagramas de caja y se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para estimar diferencias entre medias.

Las correlaciones entre los índices de diversidad alfa y los parámetros fisicoquímicos y fitotóxicos se calcularon usando la correlación de Spearman.

Las matrices de distancia de diversidad beta se utilizaron para realizar un análisis de coordenadas principales (PCoA) mediado por QIIME2 y se evaluó mediante análisis multivariado permutacional de varianza (PERMANOVA, con 999 permutaciones) la significancia entre los grupos.

### 3 Resultados

#### 3.1 Residuos crudos

##### 3.1.1 Propiedades fisicoquímicas de los residuos crudos

Se observaron diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los residuos avícolas (Tabla 3.1). Las muestras de cama mostraron valores más altos de MS, MO, pH y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; mientras que las muestras de guano lo hicieron para CE y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Por su parte, tanto el guano como la cama de pollo mostraron valores elevados de IRE, lo que indica que ambas muestras no eran biológicamente estables (> 0.5 mg O<sub>2</sub> g MO<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

**Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los residuos avícolas.**

Parámetro	Muestras	
	Guano de ponedoras	Cama de pollo
IRE (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> MO h <sup>-1</sup> )	ns 2,87±0,91	2,31±0,33
MS (%)	** 38,52±4,8	76,49±6,72
MO (%)	*** 55,17±0,57	74,80±2,27
NT (%)	ns 4,05±1,68	1,72±0,43
pH	** 7,60±0,2	8,43±0,23
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	** 9,24±0,79	5,65±0,55
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	* 127,83±61,17	14,37±8,19
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	* 3,80±0	22,18±22,86
PT (mg kg <sup>-1</sup> )	ns 10378,73±2077,67	7456,91±564,15

Resultados del análisis estadístico entre muestras usando ANOVA de una vía: ns = no significativo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Valores promedio (n=3) ± DE. IRE= índice respirométrico estático; MS = Materia seca; MO = materia orgánica; NT = nitrógeno total Kjeldahl; CE = Conductividad eléctrica; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = N-amoniaco; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = N-nitrato; PT = Fósforo total.

### 3.1.2 Ensayos de fitotoxicidad

Los índices de fitotoxicidad y los puntos finales toxicológicos permitieron observar la diferencia de sensibilidad entre las especies de plantas evaluadas. La lechuga fue la especie más sensible cuando se expuso a ambos residuos avícolas, mostrando el menor porcentaje de germinación y longitud de radícula, lo que indica una fuerte inhibición (Tabla 3.2). En contraste, el zapallito fue la especie más tolerante, mostrando una leve inhibición en la germinación pero una estimulación en el alargamiento de la radícula. Además, cuando se compararon los resultados de los dos residuos avícolas (M y L), se observó que el guano fue más tóxico que la cama para las cinco especies estudiadas, según el índice de fitotoxicidad y el punto final de toxicidad. Sin embargo, este efecto fue significativamente diferente en la germinación de semillas de lechuga y zapallito, en la elongación de radícula y RGI de lechuga y achicoria, y en GI de lechuga, rúcula y achicoria.

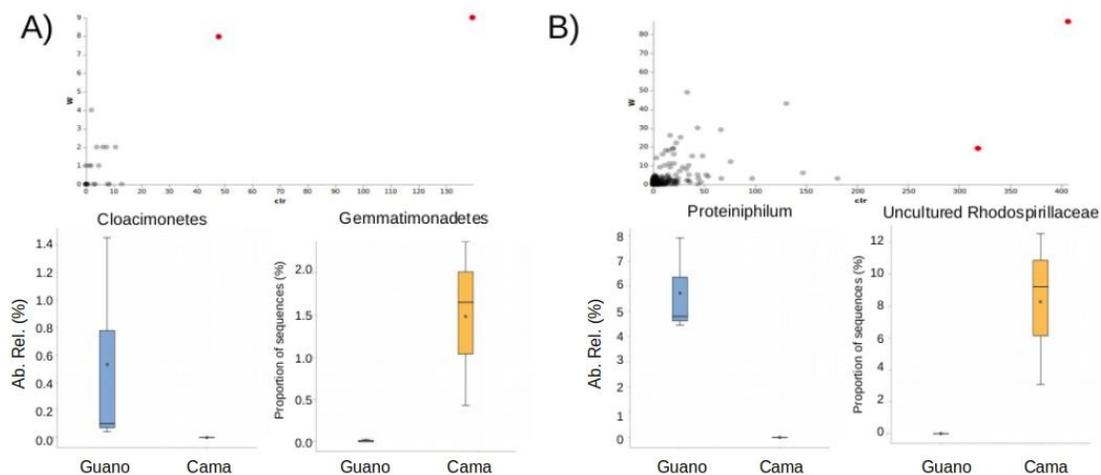
**Tabla 3.2. Puntos finales de toxicidad e índices de fitotoxicidad medios ( $\pm$  DE) para cada especie de planta expuesta a extractos acuosos de guano y cama de pollos.**

Especie	Muestra	Inhibición de germinación de semillas (%)	Inhibición elongación de radícula (%)	Índices de Fitotoxicidad	
				GI	RGI
<i>Lactuca sativa</i>	Cama	53,5 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>	71,2 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup> (I)	0,29 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> (I)
	Guano	86,0 $\pm$ 12,1 <sup>b</sup>	95,3 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	0,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup> (I)	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup> (I)
<i>Eruca sativa</i>	Cama	14,6 $\pm$ 11,2 <sup>a</sup>	53,7 $\pm$ 22,8 <sup>a</sup>	37,9 $\pm$ 13,2 <sup>a</sup> (I)	0,46 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup> (I)
	Guano	19,5 $\pm$ 26,4 <sup>a</sup>	90,3 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>	8,8 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup> (I)	0,10 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> (I)
<i>Raphanus sativus</i>	Cama	2,2 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	46,7 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>	51,8 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup> (I)	0,53 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup> (I)
	Guano	6,7 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	59,8 $\pm$ 20,3 <sup>a</sup>	38,4 $\pm$ 21,8 <sup>a</sup> (I)	0,40 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> (I)
<i>Cichorium intybus</i>	Cama	6,1 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	33,4 $\pm$ 13,2 <sup>a</sup>	62,8 $\pm$ 14,0 <sup>a</sup> (I)	0,67 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup> (I)
	Guano	24,2 $\pm$ 13,9 <sup>a</sup>	84,5 $\pm$ 16,8 <sup>b</sup>	13,1 $\pm$ 16,0 <sup>b</sup> (I)	0,15 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup> (I)
<i>Cucurbita máxima</i>	Cama	6,9 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>	-37,5 $\pm$ 42,2 <sup>a</sup>	130,4 $\pm$ 49,6 <sup>a</sup> (S)	1,37 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup> (S)
	Guano	49,4 $\pm$ 8,0 <sup>b</sup>	-23,8 $\pm$ 15,3 <sup>a</sup>	62,7 $\pm$ 13,5 <sup>a</sup> (I)	1,24 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup> (S)

Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ) para cada criterio de valoración de toxicidad o índice de fitotoxicidad evaluado en cada especie de planta. RGI = índice de crecimiento relativo; GI = índice de germinación; I = inhibición; NS = ningún efecto significativo; y S = estimulación.

### 3.1.3 Estructura de las comunidades bacterianas de residuos avícolas

Las pruebas de abundancia diferencial realizadas con ANCOM revelaron dos filos (Gemmatimonadetes y Cloacimonetes), cuatro clases (Longimicrobia, Gemmatimonadetes-S0134 grupo terrestre, Coriobacteriia y Acidimicrobiia), un orden (Rhodospirillales), cuatro familias (Rhodospirillaceae, Chitinophagaceae, Coriobacteriaceae y una familia no cultivada perteneciente a Clostridia MBA03) y dos géneros (uno no cultivable de la familia Rhodospirillaceae y Proteiniphilum) que fueron diferencialmente abundantes entre los residuos avícolas estudiados (Figura 3.1 y Tabla 3.3).



**Figura 3.1. Diagrama de volcán y gráficos de caja a nivel de filo (A) y género (B) de residuos avícolas.** Los puntos rojos en los diagrama de volcán representan taxones con diferencias estadísticamente significativas entre los residuos avícolas. La abundancia relativa de estos taxones se representa en la gráfica de caja ubicada debajo.

Los principales filos presentes en los desechos avícolas (L y M) fueron Bacteroidetes ( $29,97\% \pm 15,30\%$  para L y  $34,04\% \pm 12,89\%$  para M) y Proteobacterias ( $42,42\% \pm 10,09\%$  y  $38,09\% \pm 14,08\%$  respectivamente). Particularmente para el guano (M) se observaron mayores niveles de Firmicutes, con más del 23% de las bacterias pertenecientes a este filo (Figura 3.2A).

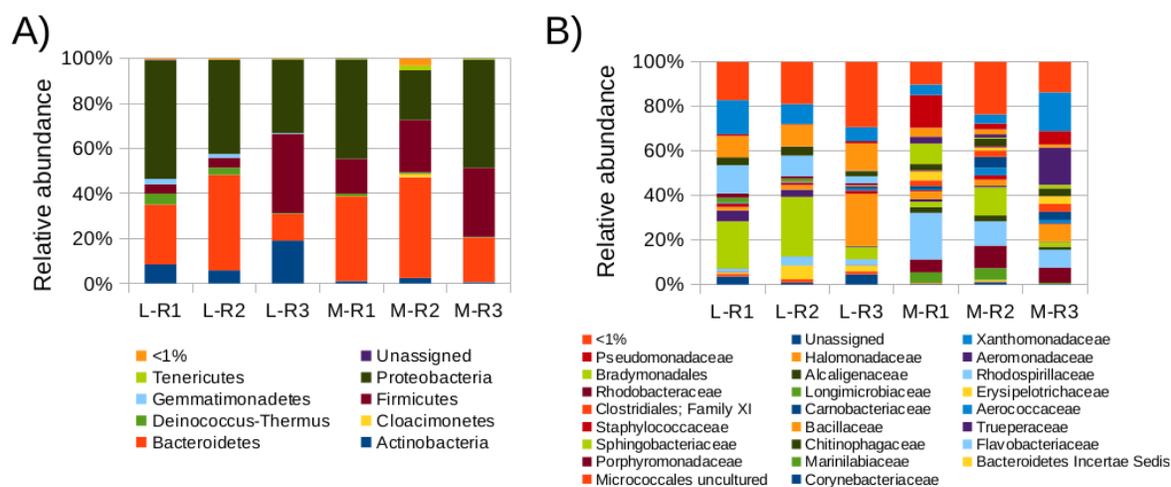
**Tabla 3.3. Taxa con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes residuos avícolas.**

Clasificación Taxonómica	Guano (% Ab. Rel.)	Cama (% Ab. Rel.)	Valor del estadístico W	diferencias de medias clr
<b>Filo</b>				
Gemmatimonadetes	0,01±0,01	1,48±0,98	9	139,85
Cloacimonetes	0,53±0,80	0±0	8	47,91
<b>Clase</b>				
Longimicrobia	0,01±0,01	1,21±1,03	11	32,18
Gemmatimonadetes; S0134 terrestrial group	0±0	0,25±0,09	10	37,73
Acidimicrobiia	0,01±0,01	0,06±0,01	3	71,37
Coriobacteria	0,04±0,01	0,01±0,01	3	101,40
<b>Orden</b>				
Rhodospirillales	0,01±0,01	8,36±4,85	56	440,02
<b>Familia</b>				
Rhodospirillaceae	0,01±0,01	8,36±4,85	54	351,39
Chitinophagaceae	2,18±0,74	0,1±0,02	3	487,49
Coriobacteriaceae	0,04±0,01	0,01±0,01	2	242,96
Clostridia; MBA03; uncultured	0,11±0,04	0,01±0,01	3	159,31
<b>Género</b>				
Rhodospirillaceae; uncultured	0,01±0,01	8,26±4,79	87	407,08
Proteiniphilum	5,73±1,91	0,01±0,01	19	319,39

Abundancia relativa (Ab. Rel.) por tratamiento expresada en porcentaje (%) como la media (n=3) ±

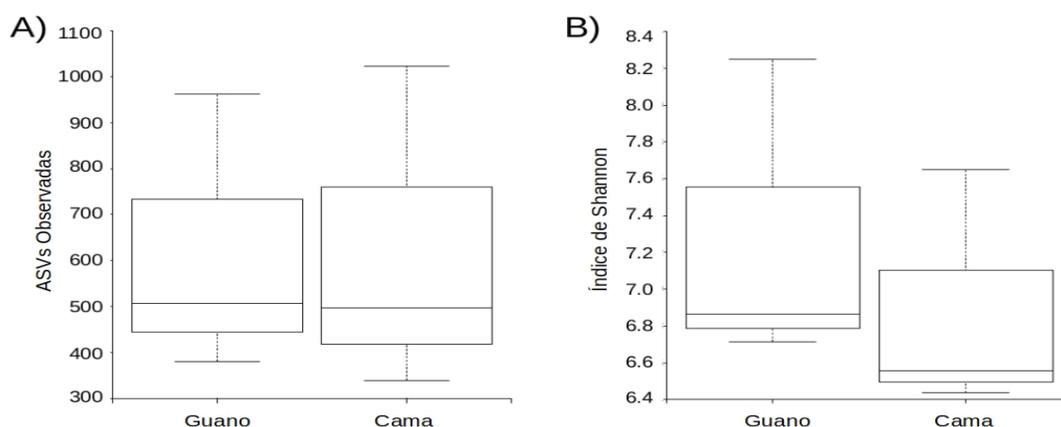
DE. Clr: centered log-ratio.

Las principales familias encontradas en las muestras L y M fueron Sphingobacteriaceae (17,81% ± 10,99% y 5,75% ± 5,97% para L y M respectivamente), Flavobacteriaceae (2,66% ± 1,31% y 13,26% ± 6,78%) y Porphyromonadaceae (2,66% ± 1,31% y 13,26% ± 6,78%) pertenecientes a Bacteroidetes. Xanthomonadaceae (10,1% ± 4,53% y 8,68% ± 7,5%), Halomonadaceae (10,58% ± 1,44% y 2,54% ± 1,34%), Rhodospirillaceae (8,36% ± 4,85% y 0,01% ± 0,01%) y Alcaligenaceae (3,31% ± 0,88% y 3,15% ± 0,36%) perteneciente a Proteobacterias; y Clostridiales-Familia XI (0,22% ± 0,2% y 2,93% ± 0,47%), Staphylococcaceae (1,35% ± 0,22% y 0,89% ± 0,99%) y Bacillaceae (9,05% ± 12,4% y 4,71% ± 2,77%) pertenecientes a Firmicutes (Figura 3.2B).



**Figura 3.2. Gráfico de barras de la estructura de las comunidades de residuos avícolas a nivel filo (A) y familia (B).** M: guano, L: cama de pollos. R1, R2 y R3 representan tres réplicas diferentes para cada tratamiento. Cada color representa taxones particulares.

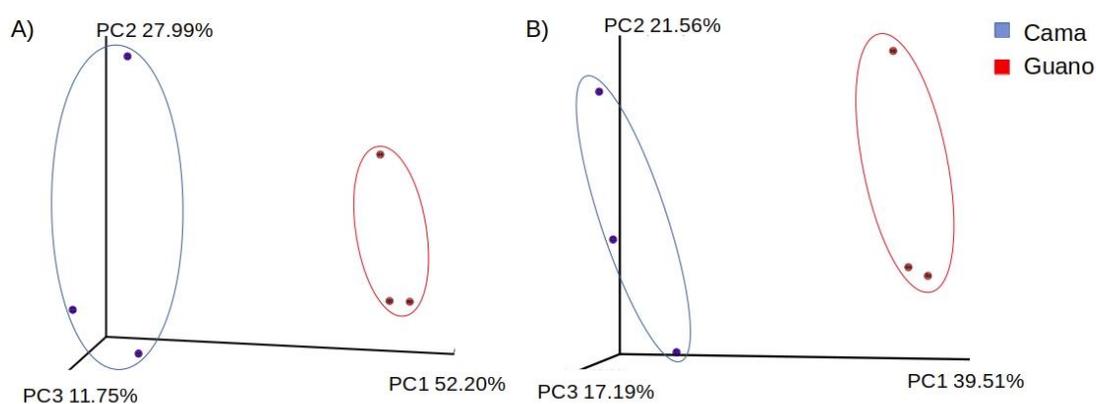
El análisis de diversidad de las comunidades bacterianas (Figura 3.3) presentes en las muestras, no mostró diferencias entre ambos tipos de residuos avícolas usando Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$  (ASVs observados:  $p = 0,83$ ; Faith-pd:  $p = 0,83$ ; índice de Shannon,  $p = 0,28$ ; uniformidad de Pielou:  $p = 0,28$ ).



**Figura 3.3. Diagramas de caja de las ASVs observadas (A) e índice de Shannon (B) para los residuos avícolas evaluados.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Adicionalmente, se calcularon los coeficientes de correlación lineal de Spearman entre los parámetros de diversidad alfa de los residuos avícolas y los parámetros fisicoquímicos y fitotóxicos. Los resultados completos se muestran en el Apéndice 3.1. Sólo se encontró una correlación negativa de Spearman estadísticamente significativa entre las ASVs observados y Faith PD con  $\text{N-NO}_3^-$  presente en las muestras ( $\rho = -1$ ,  $p = 0,0001$ ); y entre el índice de Shannon con los índices GI y RGI del zapallito (*Cucurbita maxima*) ( $\rho = -0,8857$ ,  $p = 0,0188$  y  $\rho = -0,8286$ ,  $p = 0,0416$  respectivamente).

Los análisis de beta diversidad no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de los dos tipos de residuos avícolas estudiadas, cuando se analizaron las distancias UniFrac ponderada (pseudo-F = 4,21;  $p = 0,101$ ), UniFrac no ponderada (pseudo-F = 2,522;  $p = 0,125$ ) (Figura 3.4), Jaccard (pseudo-F = 2,611;  $p = 0,095$ ) o Bray-Curtis (pseudo-F = 5,262;  $p = 0,102$ ).



**Figura 3.4.** Gráficos 3D del PCoA a partir de métricas UniFrac ponderadas (A) y no ponderadas (B) para residuos avícolas. Cada punto representa una muestra evaluada.

### 3.1.4 Efectos de la aplicación de residuos avícolas en suelos agrícolas

#### 3.1.4.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Las muestras de suelo no mostraron diferencias en su contenido de MO, NT,  $N-NH_4^+$  y  $N-NO_3^-$  (usando ANOVA de una vía,  $p > 0.05$ ). Sólo se encontraron diferencias en el tratamiento con aplicación de guano (SM) observándose modificaciones en los patrones fisicoquímicos con aumentos de pH, CE, Pe y PT (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4. Propiedades fisicoquímicas de los suelos**

Parámetro		Muestras		
		Suelo Control	Suelo + Cama	Suelo + Guano
MS (%)	**	87,73±0,93 <sup>c</sup>	84,29±0,54 <sup>b</sup>	82,55±0,25 <sup>a</sup>
MO (%)	ns	7,38±0,37	7,37±0,79	7,72±0,13
NT (%)	ns	0,37±0,05	0,26±0,23	0,18±0,17
pH	**	6,22±0,29 <sup>a</sup>	5,98±0,06 <sup>a</sup>	7,22±0,13 <sup>b</sup>
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	**	0,09±0,04 <sup>a</sup>	0,14±0,04 <sup>a</sup>	0,27±0,03 <sup>b</sup>
Pe (mg kg <sup>-1</sup> )	**	28,90±13,99 <sup>a</sup>	39,48±29,33 <sup>a</sup>	128,60±19,95 <sup>b</sup>
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	ns	0±0	0±0	0,67±1,16
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	ns	0±0	1,66±2,88	0±0
PT (mg kg <sup>-1</sup> )	***	239,10±8,49 <sup>a</sup>	304,07±19,07 <sup>a</sup>	801,99±79,39 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras basados en ANOVA de una vía: ns = no significativo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Valores promedio (n=3) ± DE. MS= materia seca; MO = materia orgánica; NT = nitrógeno total Kjeldahl; CE = conductividad eléctrica; Pe = fósforo extractable; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = N-amoniaco; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = N-nitrato; PT = fósforo total.

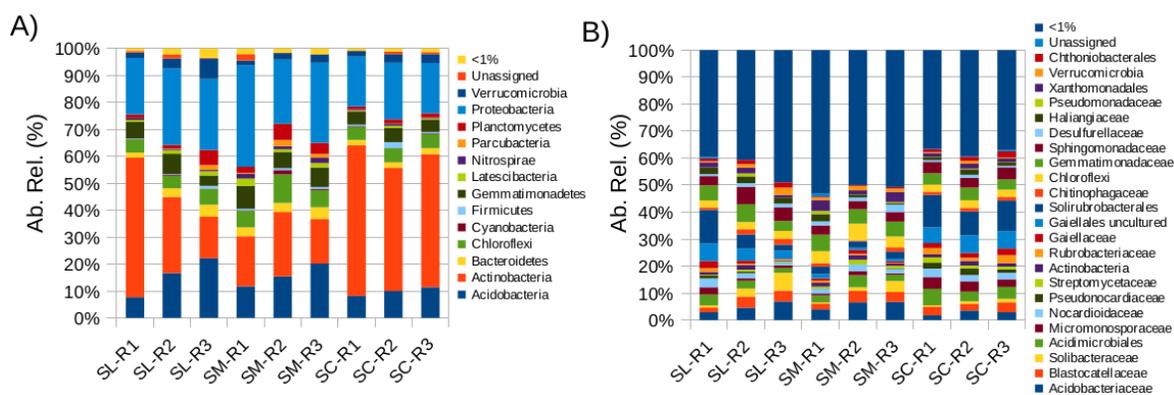
### 3.1.4.2 Estructura de comunidades bacterianas de suelos

Las pruebas de abundancia diferencial con ANCOM no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de suelo.

Los principales filos presentes en los suelos fueron Acidobacteria (9,82% ± 1,61%, 15,5% ± 7,32% y 15,76% ± 4,23% para SC, SL y SM respectivamente), Actinobacteria (50,36% ± 5,19%, 31,83% ± 18,53% y 19,72% ± 3,85%) y Proteobacterias (19,41% ± 1,43%, 25,25% ± 3,82% y 30,4% ± 6,98%) (Figura 3.5A).

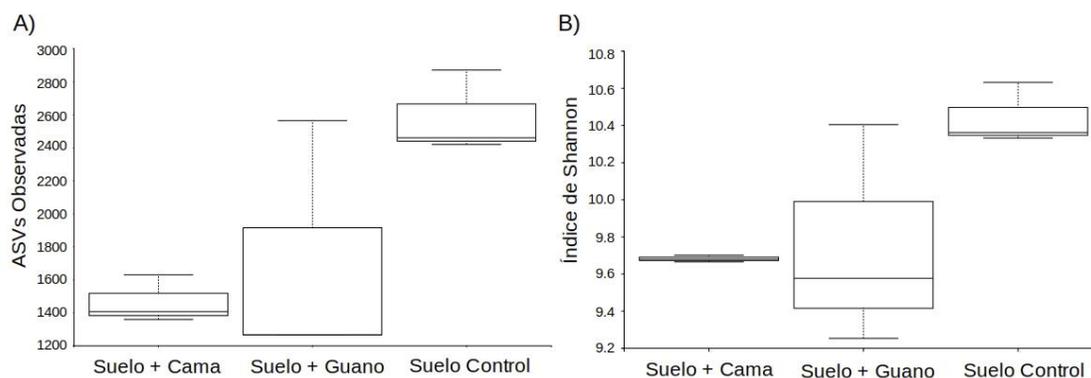
Las familias más abundantes presentes en las muestras de suelo fueron: Acidimicrobiales no cultivados (4,59% ± 1,23%, 2,88% ± 1,15% y 3,07% ± 1,19% para

SC, SL y SM respectivamente), Micromonosporaceae ( $3,26\% \pm 0,8\%$ ,  $1,52\% \pm 1,02\%$ , y  $0,96\% \pm 0,56\%$ ) y Gaiellaceae ( $8,13\% \pm 0,62\%$ ,  $5,95\% \pm 2,93\%$  y  $2,12\% \pm 0,41\%$ ), pertenecientes a Actinobacterias. Blastocatellaceae (Subgrupo 4) ( $3,17\% \pm 0,59\%$ ,  $3,26\% \pm 1,34\%$  y  $3,41\% \pm 1,09\%$ ), Acidobacterias (subgrupo 6 sin cultivar) ( $1,66\% \pm 0,45\%$ ,  $2,57\% \pm 0,8\%$  y  $5,52\% \pm 1,5\%$ ) y Solibacteraceae (Subgrupo 3) ( $0,89\% \pm 0,39\%$ ,  $3,41\% \pm 2,93\%$  y  $1,91\% \pm 1,88\%$ ), perteneciente a Acidobacterias; Gemmatimonadaceae ( $4,17\% \pm 0,43\%$ ,  $5,27\% \pm 1,47\%$  y  $5,64\% \pm 0,39\%$ ) pertenecientes a Gemmatimonadetes; y Sphingomonadaceae ( $2,56\% \pm 0,08\%$ ,  $4,42\% \pm 1,7\%$  y  $1,98\% \pm 1,09\%$ ), y Nitrosomonadaceae ( $0,86\% \pm 0,48\%$ ,  $2,12\% \pm 0,79\%$  y  $3,91\% \pm 1,34\%$ ), pertenecientes a Proteobacterias (Figura 3.5B).



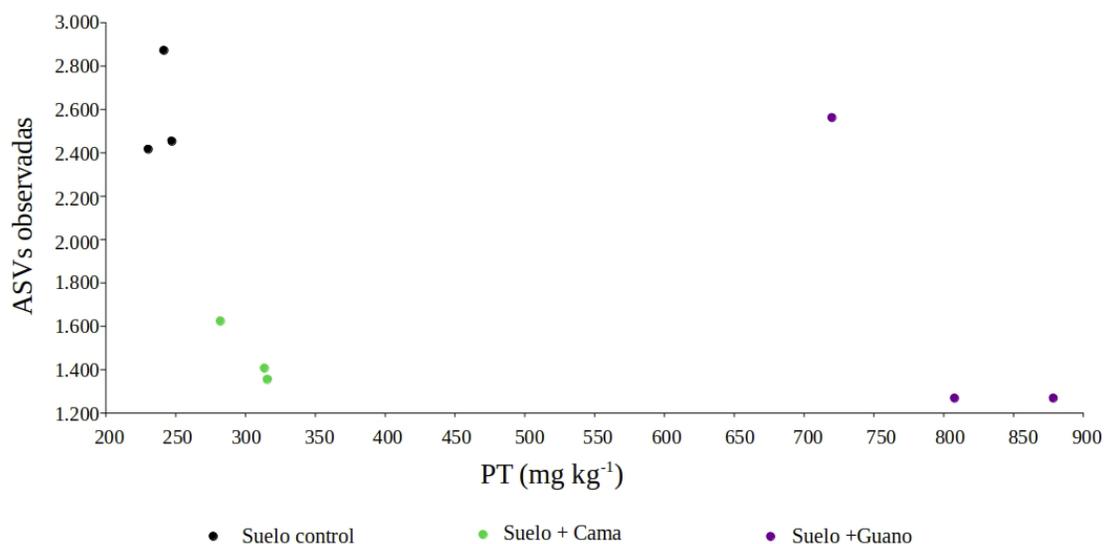
**Figura 3.5. Gráficos de barras de la estructura de comunidades microbianas presentes en suelos a nivel de filo (A) y familia (B).** SL: suelo + cama; SM: suelo + guano, SC: suelo control. R1, R2 y R3 representan tres réplicas diferentes por tratamiento. Cada color representa taxones particulares.

Los parámetros de alfa diversidad (Figura 3.6) mostraron diferencias estadísticamente significativas únicamente entre las muestras del suelo con cama y el suelo control usando Kruskal-Wallis para los parámetros ASVs observadas ( $p = 0,049$ ), Faith-pd ( $p = 0,049$ ) e índice de Shannon ( $p = 0,049$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la uniformidad de Pielou ( $p = 0,51$ ).



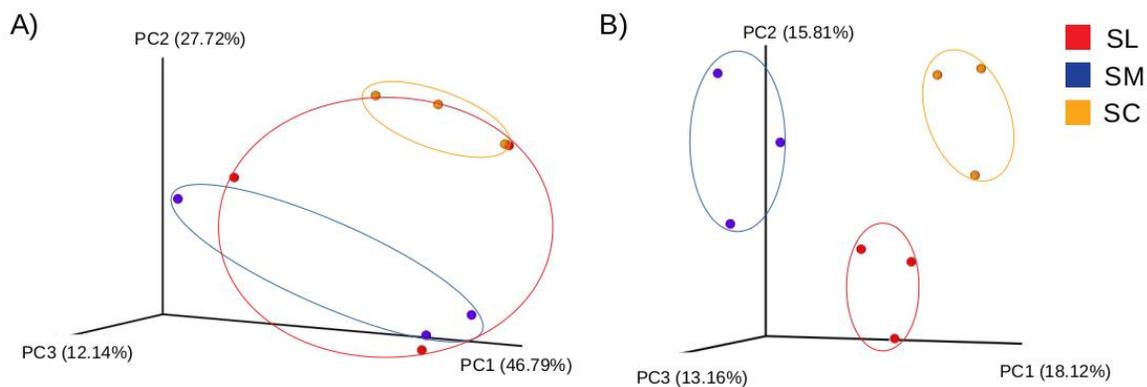
**Figura 3.6. Gráfico de caja de las ASVs observadas (A) e índice de Shannon (B) para las muestras de suelo.** Se observan diferencias estadísticamente significativas únicamente entre las muestras de suelo tratadas con cama y el tratamiento control.

Adicionalmente, se calculó el coeficiente de correlación lineal de Spearman entre los parámetros de diversidad alfa de los suelos y los posibles factores fisicoquímicos que influyen sobre ellos. Los resultados completos se muestran en el Apéndice 3.2. Sólo se encontró una correlación negativa de Spearman (Figura 3.7) estadísticamente significativa entre las ASVs observadas y el PT presente en las muestras ( $\rho = -0,6833$ ,  $p = 0,0424$ ).



**Figura 3.7. Correlación de Spearman entre las ASVs observadas y el PT de muestras de suelo.**

Los análisis de beta diversidad (Figura 3.8) lograron revelar diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de suelo al evaluar las distancias Jaccard (pseudo-F = 1,301;  $p = 0,008$ ), Bray-Curtis (pseudo-F = 1,895;  $p = 0,002$ ) y UniFrac no ponderada (pseudo-F = 1,417;  $p = 0,004$ ). Para el caso de la distancia UniFrac ponderada, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (pseudo-F = 1,516;  $p = 0,147$ ).



**Figura 3.8.** Gráficos 3D del PCoA a partir de métricas UniFrac ponderadas (A) y no ponderadas (B) para muestras de suelo. SL: suelo + cama; SM: suelo + guano, SC: suelo control. Cada punto representa muestras particulares.

## 3.2 Residuos tratados

### 3.2.1 Propiedades fisicoquímicas

Los resultados de los análisis fisicoquímicos de las enmiendas evaluadas se muestran en la Tabla 3.5. Las propiedades de las enmiendas fueron diferentes al comparar los principales parámetros (estabilidad, madurez, calidad agronómica y contenido de metales).

El guano crudo presentó los valores más altos de IRE, encontrándose por encima de los umbrales esperados según la regulación argentina (SCyMA, 2019; SCyMA y SENASA, 2019), así como el mayor contenido de MO ( $p < 0,05$ ).

El guano y el digestato presentaron valores de pH ligeramente alcalinos y valores de CE significativamente superiores a los obtenidos en el compost ( $p < 0,05$ ).

El digestato mostró valores significativamente mayores de NT y PT, cuando éstos se expresan en base seca ( $p < 0,05$ ). A diferencia del compost, el contenido de N en el guano y en el digestato se encontró principalmente en su forma reducida como amoníaco ( $\text{N-NH}_4^+$ ). Por otro lado, el contenido de N en las muestras de compost se presentó

principalmente como N orgánico. El contenido de nitratos fue insignificante en las tres enmiendas.

El contenido de elementos potencialmente tóxicos se encuentra por encima de los límites establecidos únicamente en relación al Zn presente en el guano y compost.

**Tabla 3.5. Propiedades fisicoquímicas de las enmiendas crudas (guano) y tratadas (compost y digerido)**

Parámetro	Unidades	Compost	Guano	Digerido	Norma compost	Norma digerido
MS	%	80,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	25,0 ± 0,4 <sup>ab</sup>	1,9 ± 0,4 <sup>b</sup>		
MO	%	30,8 ± 0,7 <sup>c</sup>	66,0 ± 3,3 <sup>a</sup>	44,0 ± 3,1 <sup>b</sup>	≥ 20	> 40
PT	mg Kg <sup>-1</sup> DM	9324 ± 434 <sup>a</sup>	8743 ± 1021 <sup>a</sup>	32436 ± 4 <sup>b</sup>		Declarar
Pe	mg Kg <sup>-1</sup> DM	1441,9 ± 43,1 <sup>a</sup>	8471,7 ± 3178,6 <sup>a</sup>	1532,0 ± 227,1 <sup>a</sup>		
NT	% DM	1,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	6,7 ± 1,9 <sup>a</sup>		Declarar
pH		7,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	5 - 8,5	6,5 - 8,5
CE	mS cm <sup>-1</sup>	2,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	12,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	15,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	< 4	Declarar
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg Kg <sup>-1</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	8016,1 ± 1367,2 <sup>a</sup>	2312,7 ± 187,1 <sup>ab</sup>	≤ 400	Declarar
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg Kg <sup>-1</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0		
IRE	mg O <sub>2</sub> g OM h <sup>-1</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>	≤ 0,5	≤ 0,5
Cr	mg Kg <sup>-1</sup>	16,7 ± 2,0 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>ab</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	100	150
Co	mg Kg <sup>-1</sup>	2,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,0 <sup>ab</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>		
Ni	mg Kg <sup>-1</sup>	8,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	30	30
Cu	mg Kg <sup>-1</sup>	55,9 ± 6,7 <sup>b</sup>	38,6 ± 1,8 <sup>b</sup>	86,6 ± 15,7 <sup>a</sup>	150	150
Zn	mg Kg <sup>-1</sup>	406,7 ± 39,8 <sup>a</sup>	379,3 ± 34,9 <sup>a</sup>	140,5 ± 23,5 <sup>b</sup>	300	300
As	mg Kg <sup>-1</sup>	3,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	15	15
Se	mg Kg <sup>-1</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>		
Mo	mg Kg <sup>-1</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>		
Cd	mg Kg <sup>-1</sup>	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,5	1,5
Pb	mg Kg <sup>-1</sup>	10,6 ± 2,7	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,1	100	100

Norma de compost: SCyMA y SENASA, 2019. Norma de digerido: SCyMA, 2019

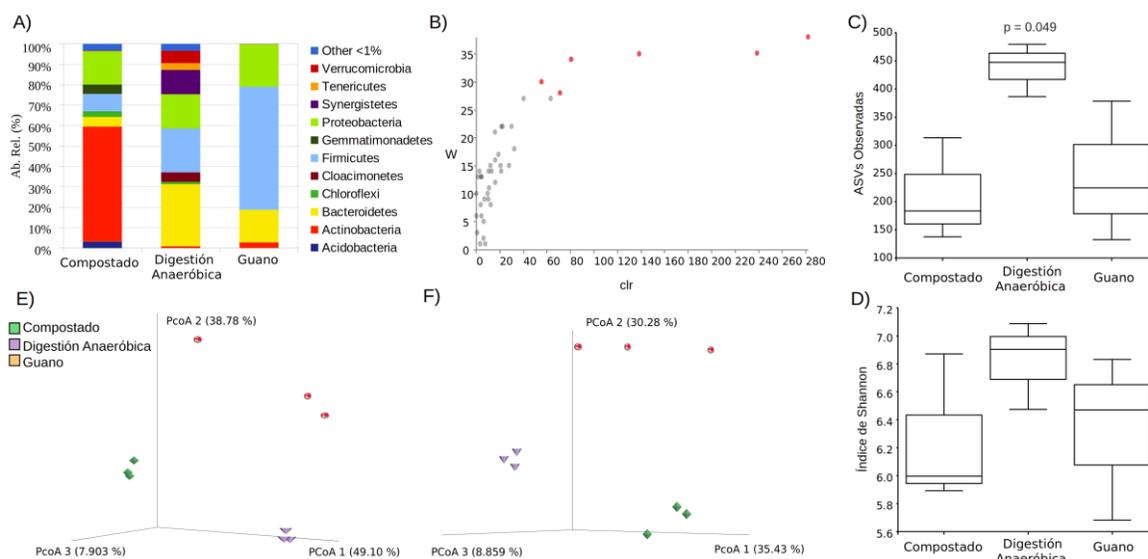
Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras basados en ANOVA de una vía. Valores promedio (n=3) ± DE. MS= materia seca; MO = materia orgánica; PT = fósforo total; Pe = fósforo extractable; NT = nitrógeno total Kjeldahl; CE = conductividad eléctrica; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = N-amoniaco; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = N-nitrato; IRE = índice respirométrico estático.

### 3.2.2 Estructura de comunidades bacterianas de residuos tratados

Se detectaron diferencias en la riqueza y la diversidad (alfa diversidad) cuando se compararon las muestras provenientes de la digestión anaeróbica frente a los otros dos tratamientos (ASV observadas,  $p = 0,049$ ; diversidad filogenética de Faith,  $p = 0,049$ ; y equitatividad de Pielou,  $p = 0,049$ ). El índice de diversidad de Shannon no fue estadísticamente diferente ( $p = 0,126$ ) (Figura 3.9c y 3.9d).

Por su parte, la diversidad beta, mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras para todas las métricas de distancia evaluadas: distancia Jaccard ( $p = 0,006$ ), distancia Bray-Curtis ( $p = 0,004$ ), distancia UniFrac no ponderada ( $p = 0,005$ ) y distancia UniFrac ponderada ( $p = 0,003$ ). Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas que puede observarse en las Figuras 3.9e y 3.9f respectivamente.

Las ASV fueron clasificadas taxonómicamente y la composición bacteriana de la comunidad, a nivel de filo, para todos los tratamientos se muestra en la Figura 3.9a. Los principales filos presentes en las muestras de Compost fueron Actinobacterias ( $56,34\% \pm 4,65\%$ ) y Proteobacterias ( $16,4\% \pm 2,55\%$ ). Para las muestras de digestión anaeróbica, Bacteroidetes ( $30,35\% \pm 2,68\%$ ) y Firmicutes ( $21,49\% \pm 2,93\%$ ) representan más del 50% de todos los filos presentes, y en las muestras de Guano se observa más del 60% de las bacterias presentes clasificadas como Firmicutes ( $60,27\% \pm 22,12\%$ ) (Figura 3.9a).



**Figura 3.9. Comparación de las comunidades microbianas provenientes de muestras de guano de pollo crudas o tratadas (compostaje o digestión anaeróbica).** (A) Abundancias relativas de los taxa a nivel filo para cada tratamiento. (B) Diagrama de volcán de las diferencias en las abundancias de las ASVs entre tratamientos expresadas a nivel de filo. ASVs diferencialmente representados se muestran marcados con puntos rojos. (C-D) Métricas de alfa diversidad para cada tratamiento. Gráficos de cajas para las ASVs observadas (C) e índice de diversidad de Shannon (D). (E-F) Gráficos de PCoA en 3D basados en las distancias UniFrac ponderadas (E) y no ponderadas (F).

Diferencias en las abundancias relativas de los taxa fueron evaluados utilizando el estadístico ANCOM revelando diferencias significativas en seis filios, cuatro clases, cuatro órdenes, tres familias y tres géneros que eran diferencialmente abundantes entre los grupos (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6. Abundancia relativa de los diferentes taxa que mostraron significancia estadística en el análisis ANCOM realizado a diferentes niveles entre enmiendas crudas y tratadas.**

Clasificación Taxonómica	Compost (% Ab. Rel.)	Digestión Anaeróbica (%.Ab. Rel.)	Guano (% Ab. Rel.)	Valor del estadístico W	diferencias medias clr
<b>Filo</b>					
Chlamydiae	0,45±0,34	0±0	0±0	28	71,39
Cloacimonetes	0±0	4,62±0,47	0±0	35	237,27
Gemmatimonadetes	4,58±2,72	0,04±0,01	0±0	30	55,63
Spirochaetae	0±0	0,94±0,09	0±0	35	138,62
Synergistetes	0±0	11,95±1,94	0±0	38	282,19
Verrucomicrobia	0,18±0,19	5,97±1,20	0±0	34	80,83
<b>Clase</b>					
Cloacimonetes Incertae Sedis	0±0	3,86±0,53	0±0	110	432,47
Erysipelotrichia	0±0	1,11±0,27	6,91±3,00	118	64,05
Clostridia	0,46±0,26	18,56±3,21	35,31±14,65	117	53,19
Synergistia	0±0	11,95±1,94	0±0	116	514,75
<b>Orden</b>					
Streptomycetales	38,22±5,48	0±0	0±0	230	730,73
Erysipelotrichales	0±0	1,11±0,27	6,91±3,00	221	65,73
Synergistales	0±0	11,95±1,94	0±0	225	618,53
Verrucomicrobia; OPB35 soil group; Ambiguous taxa	0±0	5,07±1,04	0±0	209	500,70
<b>Familia</b>					
Streptomycetaceae	38,22±5,48	0±0	0±0	400	591,28
Rikenellaceae	0±0	16,77±0,92	0±0	377	836,17
Synergistaceae	0±0	11,95±1,94	0±0	373	673,61
<b>Género</b>					
Streptomyces	38,21±5,45	0±0	0±0	714	470,60
Rikenellaceae; vadinBC27 wastewater-sludge group	0±0	16,51±0,91	0±0	687	1079,60
Thermovirga	0±0	5,04±0,76	0±0	646	728,15

Abundancia relativa por tratamiento expresada en porcentaje (%) como la media ± DE. Clr: centered log-ratio.

Los índices de diversidad alfa mostraron una correlación con algunos de los parámetros fisicoquímicos evaluados. Se encontraron asociaciones entre la estructura de la comunidad microbiana y el pH, CE, Cr, Co, Ni, Zn, As, Se, Mo y PT. Por su parte, la MS mostró correlación únicamente con la equitatividad de Pielou (Apéndice 3.3).

## 4 Discusión

### 4.1 Residuos crudos

Las diferencias encontradas en las propiedades fisicoquímicas entre los residuos avícolas utilizados mostraron correspondencia con el tipo de material analizado. Por un lado, el contenido de materia seca (MS) reflejó la composición de los diferentes residuos, con valores más altos para la cama de pollos, que está compuesta por virutas de madera y cáscaras de semillas, además de restos de comida, plumas y excrementos de aves.

El parámetro IRE está directamente relacionado con la estabilidad de los residuos avícolas y la biodegradabilidad de la MO. En el caso de enmiendas comerciales o residuos avícolas tratados, se buscan valores inferiores a  $IRE < 0,5$  para su comercialización, lo que garantiza su estabilidad. En el caso de las muestras de M y L utilizadas en este estudio, los valores describen que estos residuos se encuentran en continua modificación ya que no han sufrido ningún tipo de tratamiento previo a su aplicación, como ser compostados o digeridos anaeróticamente (Rizzo *et al.*, 2013).

Otro parámetro que mostró diferencias entre los residuos avícolas fue la conductividad eléctrica (CE). Se observaron altos valores de CE para ambos tipos de residuos, con valores mayores para las muestras de guano (M). La CE permite estimar las sales presentes en la solución del suelo (principalmente iones  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ , pudiendo también contribuir la concentración de amonio) (Rizzo *et al.*, 2020). Altos valores de CE indican que podrían generarse cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo, estrés osmótico y toxicidad iónica, pudiendo afectar la germinación de los cultivos así como procesos de importancia fisiológica en plantas (Ravindran *et al.*, 2017).

Cuando los valores de CE en la solución del suelo se encuentran por encima de  $6,0 \text{ mS cm}^{-1}$ , sólo algunos cultivos pueden tolerar esos valores de salinidad, especialmente en las etapas de germinación y primeras etapas de crecimiento vegetativo. Aunque los valores de CE pueden variar en los residuos avícolas, dependiendo de los materiales utilizados para la cama, la alimentación de los animales y las prácticas de manejo, los altos valores observados en este estudio podrían resultar en pérdidas de rendimiento, dependiendo de la frecuencia de aplicación en los suelos agrícolas y la cantidad aplicada. En este sentido, pérdidas de más del 20% fueron reportadas en cultivos de espinaca y zanahoria al analizar la aplicación de guano de ponedoras en tres tipos de suelos diferentes (Mufwanzala y Dikinya, 2010).

En relación al pH, la correlación entre este parámetro tanto con la composición de la comunidad microbiana como con la disponibilidad de nutrientes en el suelo está muy bien estudiada (Neina, 2019). Usualmente, el pH es un buen indicador de la calidad de las enmiendas, siendo los valores que se encuentran en un rango de neutralidad (desde 5,8 a 8,5) los que favorecen la disponibilidad de nutrientes para los cultivos (Ravindran *et al.*, 2017). En este sentido, si bien las muestras de cama (L) mostraron pH más alcalinos que los presentes en las muestras de guano (M), los valores encontrados se encuentran en el rango apropiado para su utilización como enmiendas de suelo.

Adicionalmente, el pH está relacionado con otras métricas, como NT,  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NH}_4^+$ . Valores de pH por encima de 7 podrían aumentar las pérdidas de nitrógeno por volatilización del  $\text{NH}_3$ . La mayor proporción de N presente en el guano y en la cama proviene del ácido úrico, el cual puede fácilmente ser transformado a amonio y, por lo tanto, ser susceptible a pérdidas de N por volatilización (Ashworth *et al.*, 2020). En este estudio, encontramos menores valores de  $\text{N-NH}_4^+$  y mayores de  $\text{N-NO}_3^-$  en la cama de

pollo, mientras que en las muestras de guano las tendencias encontradas fueron inversas. A pesar de estas diferencias, las mismas no se vieron reflejadas estadísticamente en los valores de NT entre ambos tipos de residuos.

Los altos valores descriptos en muchos de los parámetros estudiados, especialmente la alta proporción de nutrientes y CE, alerta de posibles efectos fitotóxicos que podrían generar pérdidas de rendimiento en los cultivos y representar una fuente potencial de contaminación ambiental.

Los puntos finales de ecotoxicidad utilizados en plantas, como los índices de germinación de semillas y el alargamiento de las radículas, permiten comúnmente medir la biodisponibilidad y toxicidad de los contaminantes del suelo (Carvalho Neves *et al.*, 2020; Young *et al.*, 2016). En este trabajo, se utilizaron cinco especies de plantas para evaluar la toxicidad de los residuos avícolas, sabiendo que cada especie puede mostrar un nivel diferente de sensibilidad a los contaminantes. Los índices de fitotoxicidad obtenidos al exponer estas semillas a los residuos avícolas evaluados, fueron consistentes con los reportados por otros autores (Ravindran *et al.*, 2017; Young *et al.*, 2016). El zapallito (*C. maxima*) fue el único que mostró estimulación en el índice de crecimiento relativo cuando se utilizaron extractos de guano o cama de pollo y se observó estimulación en el índice de germinación sólo para el extracto de cama. Inesperadamente, se observó una correlación negativa entre los índices de fitotoxicidad del zapallito y el índice de Shannon de los residuos avícolas utilizados, por lo que disminuciones en la diversidad de los residuos avícolas se correlacionan con baja toxicidad y podrían estimular el crecimiento y germinación de esta especie vegetal. Contrariamente y tal como nuestros resultados lo muestran para el resto de las especies vegetales, algunos autores informaron que el guano de ponedoras reduce la cantidad y el peso de los frutos y aumenta el daño de las hojas y la

incidencia de plagas en experimentos de campo con cultivos de *C. maxima* (Zakka *et al.*, 2016).

La aplicación directa de guano o cama sin tratamiento previo, podría generar lixiviados con efectos fitotóxicos. En este sentido, varios autores han mostrado dificultades para reducir la toxicidad provocada por los residuos avícolas aun siendo tratados mediante compostaje (Komilis y Tziouvaras, 2009; Young *et al.*, 2016) o digestión anaeróbica (Bres *et al.*, 2018). En el presente trabajo, se demostró que el guano fue más tóxico que la cama, lo que podría estar relacionado con valores más altos de CE y N-amoniaco, tal como lo describieron otros autores (Bittsánszky *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2012). Su utilización sin tratamiento previo, representa una posible fuente de contaminación y pérdidas de productividad. Recientemente, Muhammad *et al.* (2020) también reportaron riesgos potenciales asociados a la bioacumulación de metales en cultivos fertilizados con residuos avícolas.

El análisis de las comunidades de bacterias presentes en ambos tipos de muestras (M y L), mostraron predominancia de Bacteroidetes y Proteobacteria y, particularmente, las muestras de M mostraron altos valores de Firmicutes.

El filum Bacteroidetes comprende bacterias ampliamente distribuidas en el ambiente. Aunque algunas *Bacteroides spp.* pueden ser patógenos oportunistas, muchos Bacteroidetes son especies mutualistas adaptadas al tracto gastrointestinal. Estas bacterias, realizan conversiones metabólicas que son esenciales para el hospedador, como la degradación de proteínas o polímeros complejos de hidratos de carbono (Wexler, 2007).

Por su parte, las Proteobacteria son un filo importante de bacterias que comprende una amplia variedad de géneros patógenos para humanos, animales y plantas. Otras son de

vida libre (no parasitarias) e incluyen muchas de las bacterias responsables de la fijación de nitrógeno (Gupta, 2000).

Por último, los miembros del filo Firmicutes suelen estar presentes en el tracto gastrointestinal de los animales. Este filo ha sido reportado como copiótrofo, es decir que presenta mayores tasas de crecimiento en ambientes ricos en C y nutrientes (Urrea *et al.*, 2019).

Las principales familias encontradas en los residuos avícolas fueron miembros típicos del tracto gastrointestinal de las aves, que suelen estar implicados en la degradación de sustancias alimentarias. Además, algunos de ellos podrían ser fuentes potenciales de contaminación y mostrar efectos patógenos (Tabla 3.7).

La presencia de estos microorganismos con capacidad de afectar la salud animal, vegetal y humana, es uno de los principales riesgos de la aplicación de desechos avícolas sin tratamiento previo como enmienda en suelos agrícolas. Este riesgo resulta mayor en los entornos artificiales, como los agroecosistemas, dado que son menos diversos que los ambientes prístinos. Algunas posibles razones para la supresión de patógenos y enfermedades en ecosistemas microbiológicamente diversos es la mayor posibilidad de encontrar antagonistas, competidores de recursos y depredadores de patógenos en el suelo, la rizósfera, las plantas o los animales (van Bruggen *et al.*, 2019).

**Tabla 3.7. Principales familias encontradas en las comunidades de bacterias presente en los residuos avícolas.**

Familia	Descripción
<b>Bacteroidetes</b>	
Sphingobacteriaceae	Compuesta por ocho especies del género <i>Sphingobacterium</i> . Algunas se han asociado a bacteriemias, peritonitis e infección respiratoria crónica en pacientes con afección subyacente grave y mostraron resistencia a múltiples fármacos (Yang <i>et al.</i> , 2013)
Flavobacteriaceae	<i>Flavobacteria</i> y <i>Pseudomonas</i> , conocidas por causar deterioro en los alimentos y productos alimenticios (de Beer <i>et al.</i> , 2005).
Porphyromonadaceae	Se sugiere a esta familia con un rol importante en la degradación de ácidos grasos volátiles (Poirier <i>et al.</i> , 2016)
<b>Proteobacterias</b>	
Xanthomonadaceae	Familia con 22 géneros, incluidos los fitopatógenos <i>Xylella</i> , <i>Xanthomonas</i> y <i>Stenotrophomonas</i> , causantes de enfermedades importantes en cultivos y ornamentales (Huang <i>et al.</i> , 2017).
Halomonadaceae	Contiene dos géneros, <i>Halomonas</i> y <i>Deleya</i> . Las halomonas se aislaron de ambientes salinos, incluidos salares, estuarios intermareales, el océano abierto y lagos hipersalinos, y exhiben una tolerancia extrema al NaCl (Vreeland, 1992).
Rhodospirillaceae	Comprenden diferentes tipos morfológicos de bacterias fototróficas que pueden fotoasimilar compuestos orgánicos simples en condiciones anaeróbicas. Ampliamente distribuidas en la naturaleza y en entornos artificiales y pueden ser estimuladas por la contaminación (Biebl y Pfennig, 1981).
Alcaligenaceae	Se ha reportado al orden Alcaligenes como bacterias portadoras de genes de resistencia a la tetraciclina e integrones de clase 1 (Agersø y Sandvang, 2005)
<b>Firmicutes</b>	
Clostridiales-Family XI	Presente típicamente en el guano de aves (Mao <i>et al.</i> , 2020)
Staphylococcaceae	Comúnmente presente en el guano de aves (Videnska <i>et al.</i> , 2014)
Bacillaceae	Ampliamente distribuida en la naturaleza. Presenta resistencia a los cambios de pH, salinidad y temperatura, así como a muchos productos químicos. Son contaminantes comunes de los hábitats artificiales (Coleri Cihan <i>et al.</i> , 2017).

Para prevenir la liberación de microorganismos patógenos y parásitos al medio ambiente, debe evitarse la aplicación de residuos crudos en el suelo. En este sentido, se creó el enfoque "Una salud" para diseñar e implementar herramientas novedosas que permitan no sólo controlar las enfermedades zoonóticas sino también enfocarse en la posible propagación de la resistencia a los antibióticos u otras amenazas relacionadas con la interfaz humano-animal-ecosistema (WHO, 2017).

Como respuesta a esta demanda, el compostaje y la digestión anaeróbica son las dos tecnologías más estudiadas para el tratamiento de los desechos avícolas y podrían contribuir a reducir la transferencia de este tipo de contaminante al medio ambiente (Rizzo *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2016).

#### **4.2 Efectos de la aplicación de residuos avícolas en suelos agrícolas**

De acuerdo con el análisis de los suelos enmendados con residuos de la producción aviar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en algunos de los parámetros fisicoquímicos evaluados.

Los suelos que habían sufrido aplicaciones de guano de ponedoras (SM) mostraron valores más altos de CE, pH, PT y Pe, que aquellos a los que se les había aplicado cama de pollo (SL) o que los suelos control (SC).

Se sabe que en suelos, valores de CE > 4 afectan la productividad de la mayoría de los cultivos, siendo recomendados valores inferiores a 1 en la solución del suelo. Como se mencionó anteriormente, la alta frecuencia de aplicación o altas dosis de residuos avícolas con alta CE podría aumentar la salinidad del suelo y causar inhibición en el crecimiento de las plantas (Burton y Turner, 2003).

Nuestros resultados mostraron que, aunque ambos residuos avícolas tenían valores de CE superiores a 4, su aplicación al suelo no incrementó los valores de CE por encima de 1. El tratamiento SM mostró los valores de CE más altos y el de SL no mostró diferencias estadísticamente significativas con el suelo control. Ya en 1985, Barth (1985) propuso que a pesar de los beneficios de los abonos orgánicos, que aportan micro y oligoelementos que necesitan las plantas, su aplicación aumentará la conductividad eléctrica del suelo. Particularmente para los desechos avícolas, esto también puede atribuirse estrechamente al tipo de alimento que consumen estas aves, que es rico en calcio, fósforo y potasio (Alabadan *et al.*, 2009).

En relación al pH, sólo se observaron cambios en el tratamiento SM y no en el SL con respecto al suelo control, aun cuando la cama de pollos mostró valores más altos que el guano de ponedoras para este parámetro. Los efectos de estos residuos en el pH del suelo, probablemente dependan de las tasas de aplicación y del tipo de suelo (capacidad buffer), por lo que las diferencias encontradas entre tratamientos podrían deberse a la diferencia en las frecuencias y cantidad de residuo aplicado.

Es importante resaltar que si bien se observó un aumento en el pH del tratamiento SM, este no supera el valor de 8,5. Tal como ya fue mencionado, el rango óptimo de pH esperado en suelos es de 5,5-8,5; ya que cuando los valores son menores a 5,5 se observan deficiencias de algunos nutrientes y cuando los valores son superiores a 8,5 se muestra una disminución en la solubilidad de otros (Neina, 2019).

Otros de los parámetros estudiados que mostraron diferencias estadísticamente significativas, debido a la aplicación de residuos, entre los suelos tratados y el suelo control, fueron el PT y el Pe. El fósforo es un elemento de importancia crítica para la nutrición de las plantas. El mismo se encuentra presente en el suelo de forma insoluble,

mientras que las plantas sólo pueden incorporarlo como  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , por lo que las bacterias solubilizadoras de fosfato tienen un rol importante en la nutrición de fósforo en plantas (Santi *et al.*, 2013).

Si bien no se observaron diferencias significativas en los valores de PT presente en los diferentes tipos de residuos avícolas, los suelos enmendados con dichos residuos mostraron valores de PT y Pe significativamente diferentes, encontrándose valores más elevados en los suelos enmendados con guano (SM) respecto a los observados en SL o SC.

El contenido de PT en suelos varía entre 200 y 500  $\text{mg Kg}^{-1}$  (Arai y Sparks, 2007; Patiño-torres y Sanclemente-Reyes, 2014). Estos valores se corresponden con los encontrados en esta tesis para SC y SL (SC =  $239,10 \pm 8,49 \text{ mg Kg}^{-1}$ ; SL =  $304,07 \pm 19,07 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), pero como se mencionó anteriormente, el tratamiento con aplicación de guano (SM) mostró valores muy superiores a este rango (SM =  $801,99 \pm 79,39 \text{ mg Kg}^{-1}$ ).

Otros autores encontraron resultados similares, informando que la aplicación de guano crudo aumenta las concentraciones tanto de PT como soluble, lo que sugiere que la aplicación de este residuo proporciona una fuente de reposición del P presente en la solución del suelo (Oladipupo *et al.*, 2020; Waldrip *et al.*, 2011).

Además, Waldrip *et al.* (2011) informaron que la incorporación de guano de ponedoras al suelo promovió la transformación y mineralización de P orgánico e inorgánico menos lábil, en Pi lábil en la rizósfera, lo que resultó en concentraciones más altas de P en las raíces.

Por otro lado, la acumulación de P en suelos agrícolas resultante de la aplicación de fertilizantes inorgánicos, abonos orgánicos y aguas residuales, como la que se observa en este estudio, podría aumentar las pérdidas potenciales de P, incluso a pesar de la alta capacidad de fijación de P de los suelos. El movimiento vertical de P a través del perfil del

suelo generalmente se considera de poca importancia, a menos que los suelos se saturen con P, especialmente después de aplicaciones de grandes cantidades de guano (Heckrath *et al.*, 1995).

Heckrath *et al.* (1995) describieron un valor de P-Olsen de  $60 \text{ mg Kg}^{-1}$  como umbral ambiental, o punto de inflexión, por encima del cual se ha demostrado que la lixiviación de P es significativa. Nuestros resultados de Pe mostraron valores que superan este umbral para SM ( $Pe = 128,60 \pm 19,95 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). Este alto valor de P podría aumentar el riesgo de contaminación, lo que provocaría una mayor pérdida de fosfato y la consiguiente degradación de los recursos de agua dulce, donde la eutrofización puede desencadenarse por aportaciones adicionales de P (Zhu *et al.*, 2018).

A pesar de todas las diferencias encontradas en los parámetros fisicoquímicos entre el tratamiento SM con respecto al SC, el análisis de las comunidades bacterianas no mostró diferencias entre los suelos enmendados y el suelo control.

Los perfiles de las comunidades bacterianas de los suelos (SC, SL y SM) no cambiaron después de la aplicación de los residuos avícolas. La composición de las muestras de suelo tratadas y del suelo control, mostraron mayores proporciones de Actinobacteria (con valores que oscilan entre 15-55%), Acidobacterias (entre 7-22%) y Gemmatimonadetes (3-8%) en comparación con las muestras de los residuos avícolas.

En el suelo, las Actinobacterias suelen encontrarse en un alto porcentaje, ayudando a descomponer la materia orgánica de los organismos muertos y a la solubilización de fosfatos y de carbonato de calcio (Huang *et al.*, 2017). Algunas actinobacterias del suelo (como *Frankia sp.*) viven en simbiosis con un amplio espectro de plantas, fijando nitrógeno para la planta huésped a cambio de carbono reducido (Santi *et al.*, 2013). Otras especies,

como muchos miembros del género *Mycobacterium*, son patógenos importantes (Barka *et al.*, 2016).

Las actinobacterias son uno de los filos dominantes y contienen uno de los géneros bacterianos más grandes, *Streptomyces*, así como otras actinobacterias que son los principales contribuyentes a la capacidad buffer de los suelos (Manteca y Sanchez, 2009).

Las acidobacterias son un filo compuesto por bacterias fisiológicamente diversas y ubicuas, especialmente en los suelos, pero están infrarrepresentadas en los cultivos (Navarrete *et al.*, 2015).

El filo Gemmatimonadetes constituye aproximadamente el 2% de las comunidades bacterianas del suelo y se ha identificado como uno de los nueve filos principales que se encuentran en dichos ambientes (Hanada y Sekiguchi, 2014; Janssen, 2006).

En el presente trabajo, las familias bacterianas más importantes encontradas en los suelos mostraron estar involucradas en mejorar la fertilidad del suelo (participando principalmente en los ciclos de nutrientes como C y N), así como en promover el crecimiento de las plantas (inhibiendo patógenos a través de la secreción de antibióticos, compitiendo por el espacio o estimulando la producción de fitohormonas o la producción de sideróforos) (Tabla 3.8).

**Tabla 3.8. Principales familias encontradas en las comunidades de bacterias presentes en los suelos.**

Familia	Descripción
<b>Actinobacterias</b>	
Acidimicrobiales	Mejorar la fertilidad del suelo y la eficiencia del crecimiento de las plantas (Wang <i>et al.</i> , 2019)
Micromonosporaceae	Mejorar la fertilidad del suelo y la eficiencia del crecimiento de las plantas (Wang <i>et al.</i> , 2019)
Nocardioideaceae	Degradan el sulfametoxazol (antibiótico más frecuentes en aguas residuales, aguas superficiales y suelos) (Ouyang <i>et al.</i> , 2019). Nocardioideaceae se ha asociado con el desarrollo de rasgos morfológicos específicos de la raíz (Luo <i>et al.</i> , 2019)
Solirubrobacteraceae	Las solirubrobacteraceae son aerobias que utilizan muchos azúcares y algunos otros compuestos como únicas fuentes de carbono (Whitman y Suzuki, 2015)
Solirubrobacterales Elev-16S-1332	Degradan contaminantes e inhiben patógenos (Zhang <i>et al.</i> , 2020)
Pseudonocardiaceae	Contienen una gama de mecanismos de tolerancia y resistencia a metales (Luo <i>et al.</i> , 2019)
Gaiellaceae	Degradan contaminantes e inhiben patógenos (Zhang <i>et al.</i> , 2020)
Rubrobacteriaceae	Típicas bacterias de ambientes semiáridos (Bachar <i>et al.</i> , 2010). Pueden ser importantes en la adquisición de carbono inorgánico en suelos desérticos, dada su alta plasticidad en el metabolismo quimioautótrofo (León-Sobrino <i>et al.</i> , 2019)
Streptomycetaceae	Secretan antimicrobianos inhibiendo patógenos. Contienen una gama de mecanismos de tolerancia y resistencia a metales. Producen productos metabólicos que afectan a sus huéspedes (fitohormonas, sideróforos, desaminasa ACC) (Luo <i>et al.</i> , 2019)
<b>Acidobacterias</b>	
Blastocatellaceae (Subgrupo 4)	Benéficas en la recuperación de suelos debido a su capacidad de descomposición de sustratos de carbono. Son oligotróficas, con mayor eficiencia en la utilización de la reserva orgánica recalcitrante. Mejoran el ciclo de nutrientes. Son acidófilas y correlacionan negativamente con el pH del suelo (Qin <i>et al.</i> , 2019)
Acidobacteria (uncultured Subgrupo 6)	Correlacionan positivamente con la disponibilidad de nutrientes y negativamente con propiedades vinculadas a la acidez del suelo (Navarrete <i>et al.</i> , 2015)

Solibacteraceae (Subgrupo 3)	Se asocian con la resistencia de algunos hongos patógenos (como <i>Fusarium oxysporum</i> ) y su abundancia relativa aumenta a medida que aumenta el contenido de agua. Además, participa en el ciclo del carbono del suelo (Zhang <i>et al.</i> , 2019)
Acidobacteriaceae (Subgrupo 1)	Copiótrofos comunes y potencialmente contribuyen a un consorcio de taxones que consumen celulosa, hemicelulosa y quitina en suelos quemados. Heterótrofos acidófilos moderados capaces de reducir Fe (III) (Hallberg <i>et al.</i> , 2010).
<b>Gemmatimonadetes</b>	
Gemmatimonadaceae	Mejoran la fertilidad del suelo y la eficiencia del crecimiento de las plantas (Wang <i>et al.</i> , 2019)
<b>Proteobacterias</b>	
Sphingomonadaceae	Participan en el ciclo del nitrógeno (Wang <i>et al.</i> , 2019), degradan contaminantes e inhiben patógenos (Zhang <i>et al.</i> , 2020)
Nitrosomonadaceae	Participan en el ciclo del nitrógeno (Wang <i>et al.</i> , 2019)
Haliangiaceae	Crecen en sustratos orgánicos insolubles. Algunas de ellas son productoras de importantes antibióticos médicos.
Desulfurellaceae	Respiración del azufre
<b>Bacteroidetes</b>	
Chitinophagaceae	Degradan polisacáridos como celulosa y quitina (Chen <i>et al.</i> , 2020)
<b>Verrucomicrobia</b>	
DA101 soil group (Chthoniobacterales)	Abundantes y ubicuas en suelos, se caracterizan por ser heterótrofas aeróbicas con muchas auxotrofias de aminoácidos y vitaminas (Brewer <i>et al.</i> , 2016)
<b>Planctomycetes</b>	
Planctomycetaceae	Parte del ciclo del nitrógeno, llevan a cabo la oxidación anaeróbica del amonio (Fuerst y Sagulenko, 2011)
<b>Nitrospirae</b>	
Nitrospiraceae	Transformación de N, esencial para la nitrificación del suelo (Chen <i>et al.</i> , 2020)

La aplicación de residuos avícolas durante tiempos prolongados mostró una disminución en los valores de diversidad alfa obtenidos para el tratamiento con cama. Una tendencia similar fue observada en las muestras de suelo con aplicación de guano aunque no lograron verificarse estadísticamente. Posiblemente, esto se deba al comportamiento de una de las réplicas y el bajo número de muestras utilizadas, por lo que deberían incluirse mayor número de muestreos para verificar esta disminución en dicho tratamiento.

Además pudo observarse una correlación negativa entre la riqueza (ASVs observadas) y los valores de PT presentes en las muestras de suelo. Esto es importante ya que los suelos tienen una de las comunidades bacterianas más diversas conocidas y se sabe que existe una correlación entre la diversidad y la funcionalidad de la comunidad. Mantener estables y altos los valores de diversidad en los suelos, luego de la aplicación de enmiendas, es de gran importancia para no alterar algunas de las funciones que estas comunidades realizan en los suelos y que son de vital importancia para el crecimiento de los cultivos (Girvan *et al.*, 2005). En este sentido, se sabe que hay un número limitado de funciones a realizar dentro de un ecosistema y que las comunidades del suelo exhiben un alto grado de redundancia funcional (Girvan *et al.*, 2005). Esta característica es importante para la biodiversidad ya que permite mantener el funcionamiento del ecosistema cuando sufre modificaciones, brindando una mayor probabilidad de que algunas especies que son capaces de realizar una determinada función permanezcan presentes (Wagg *et al.*, 2019).

En relación a la estructura de estas comunidades, Celestina *et al.* (2019) encontraron que la aplicación de fertilizantes o guano a escala de campo, no tiene impactos duraderos significativos en las comunidades microbianas del suelo, describiendo que las diferencias encontradas se debían mayormente a su ubicación dentro del perfil del suelo y no al tipo de enmienda aplicada o su método de aplicación. Además, Sun *et al.* (2015) encontraron

resultados similares, con efectos insignificantes de las bacterias introducidas del estiércol de ganado en la comunidad bacteriana del suelo.

Nuestros datos implican que si bien pudieron observarse diferencias en el análisis de diversidad, las bacterias introducidas por la aplicación de los desechos avícolas jugaron un pequeño papel en el cambio de estructura de la comunidad bacteriana del suelo, demostrando su capacidad de resiliencia a las perturbaciones.

En ese sentido, aunque el análisis de las comunidades bacterianas del suelo es una herramienta poderosa para comprender el impacto que las prácticas agrícolas tienen en el suelo, la capacidad de resiliencia de estas comunidades podría ocultar el riesgo potencial del uso de la aplicación de desechos avícolas como enmienda del suelo. Para reflejar mejor su impacto, se necesitan estudios multidisciplinarios que aborden diferentes aristas del problema, incluido el enfoque fisicoquímico, ecotoxicológico y microbiológico.

### **4.3 Residuos tratados**

Los resultados obtenidos revelaron diferencias significativas en la composición de la microbiota en función de los tratamientos realizados.

En las muestras de guano se encontraron aumentos en la abundancia de la clase Clostridia y el orden Erysipelotrichales. Ambos taxa pertenecen al filo Firmicutes y suelen ser miembros del tracto gastrointestinal de humanos y animales. Las bacterias pertenecientes a este filo han sido reportadas como copiótrofas, es decir que muestran mayores tasas de crecimiento en ambientes ricos en carbono y nutrientes (Urrea *et al.*, 2019). En las muestras de compost, se encontraron aumentos significativos del filo Gemmatimonadetes y del género *Streptomyces*. El filo Gemmatimonadetes constituye

aproximadamente el 2% de las comunidades bacterianas del suelo y ha sido identificado como uno de los nueve filos principales encontrados en los suelos (Hanada y Sekiguchi, 2014; Janssen, 2006). Por su parte *Streptomyces*, es el género más importante de actinobacterias y se encuentra comúnmente en el suelo y es reconocido como saprófito. Las bacterias pertenecientes a este género tienen un papel importante en la ecología de los suelos dada su capacidad de biodegradación (Law *et al.*, 2019). Además, las bacterias pertenecientes al filo Actinobacterias son buenas indicadores del funcionamiento correcto del proceso de compostaje.

Por otro lado, en las muestras que fueron sometidas a digestión anaeróbica, pudimos encontrar un aumento en el filo Cloacimonetes, el orden Verrucomicrobia\_OPB35 (grupo encontrado en muestras de suelo), la familia Synergistaceae, y los géneros Rikenellaceae\_*vadinBC27* (grupo encontrado en muestras de lodos y aguas residuales) y *Thermovirga*. Las bacterias del filo Cloacimonetes se encuentran comúnmente en las plantas de tratamiento de aguas residuales y tienen una función proteolítica, degradando aminoácidos. El incremento de Candidatus Cloacimonetes ha sido reportado por otros autores en digestores anaeróbicos relacionados con la acumulación de propionato, ya que estos organismos pueden fermentar aminoácidos y oxidar el propionato en H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y acetato (Braz *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019).

El orden Verrucomicrobia está muy extendido en el medio ambiente y es particularmente abundante en los suelos. El grupo de bacterias de suelos OPB35, un clado importante de la subdivisión 3 del orden Verrucomicrobia, ha sido aislado principalmente de suelos, humedales y fuentes de agua dulce (Yang *et al.*, 2016).

Las bacterias pertenecientes a la familia Synergistaceae han sido descritas como degradadoras anaeróbicas de aminoácidos y oxidantes de acetato. Su presencia también se

asocia con un rendimiento acetotrófico eficiente. Además, esta familia también se ha aislado de un cultivo que lograba degradar compuestos hexadecanos (Poirier *et al.*, 2016).

Las bacterias pertenecientes al subgrupo no cultivado Vadin BC27, dentro del orden Bacteroidales, ha sido identificado previamente como uno de los principales linajes presentes en los digestores anaeróbicos ya que está implicado en la fermentación anaeróbica de lodos u otras fuentes carbonadas (Morrison *et al.*, 2017).

*Thermovirga* es un género perteneciente a la familia Synergistaceae, con sólo una especie conocida. Es capaz de fermentar sustratos proteicos, algunos aminoácidos y un número limitado de ácidos orgánicos (Dahle y Birkeland, 2006).

En relación a los parámetros fisicoquímicos de las tres enmiendas (guano crudo, compostado y digerido), se encontraron diferencias al comparar los principales parámetros de estabilidad, madurez, calidad agronómica y contenido de contaminantes.

La estabilidad biológica en el compost se encontró dentro de los valores establecidos, mientras que el digestato mostró valores cercanos a los límites permitidos. Por su parte, los valores de IRE del guano crudo mostraron que este tipo de muestra no es estable ( $2,4 \pm 0,6$  mg O<sub>2</sub> g OM h<sup>-1</sup>). Varios autores destacan la importancia de los índices de estabilidad para comparar el grado de biodegradabilidad de la materia orgánica presente en un residuo. Este índice permite evaluar la eficiencia de los procesos de estabilización y la calidad de las enmiendas (Bernal *et al.*, 2017).

El guano crudo y el digestato presentaron valores de pH ligeramente alcalinos y valores de CE significativamente superiores a los obtenidos en el compost. Albuquerque *et al.* (2012) evaluaron el uso potencial de diversos digestatos anaeróbicos como fertilizantes y advirtieron el especial cuidado que debe tenerse, ya que dosis excesivas o aplicaciones

continuas de digestatos con alta CE, podrían conducir a un aumento de la salinidad del suelo e inhibir el crecimiento de las plantas.

El digestato, además, mostró valores significativamente mayores de NT y PT. Como se mencionó anteriormente, los excesos de nutrientes pueden generar efectos fitotóxicos en algunas especies y contaminación de napas y cuerpos de agua debido a pérdidas por escorrentía o lixiviación de los mismos.

Por su parte, en relación al contenido de elementos potencialmente tóxicos, sólo se encontraron valores por encima de los límites establecidos en el contenido de Zn presente en las muestras de guano crudo y compost. Todas las demás elementos analizados presentaron valores por debajo de los límites establecidos. Los altos contenidos de Zn en el guano crudo fueron también reportados por otros autores, quienes atribuyen la presencia de Zn, Mn, Fe y Cu a la dieta de las aves, ya que estos elementos se agregan como aditivos para reducir enfermedades, para incrementar la producción de huevos y como promotores del crecimiento (Bloem *et al.*, 2017).

## **5 Conclusiones**

En este trabajo fue posible caracterizar los efectos de las prácticas agronómicas típicas que se llevan a cabo en regiones donde la producción agrícola y aviar se realizan de manera conjunta en Argentina.

Los residuos avícolas revelaron altas concentraciones de nutrientes y alta CE, junto con efectos fitotóxicos sobre los ensayos de germinación de semillas. Así mismo, al evaluar el impacto de las aplicaciones históricas de residuos sobre suelos agrícolas, se observó una

vinculación entre el uso de guano crudo y el aumento del valor del PT y Pe, advirtiendo sobre el riesgo de contaminación por pérdida de fosfato y posterior degradación de agua dulce y eutrofización.

Las comunidades bacterianas presentes en los residuos avícolas estuvieron dominadas por miembros típicos del tracto gastrointestinal de las aves, destacando la presencia de bacterias patógenas que podrían representar fuentes potenciales de contaminación. No obstante, nuestros resultados mostraron que las comunidades bacterianas de suelos sometidos a aplicaciones de dichos residuos estaban dominadas por grupos relacionados con los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y con la presencia de bacterias con conocido efecto de promoción del crecimiento vegetal, evidenciando la capacidad de resiliencia de estas comunidades de suelo. Aun así, no podemos descartar la presencia de grupos bacterianos preocupantes provenientes del guano de ponedoras y de la cama de pollos, que podrían amenazar la sustentabilidad de este escenario agrícola.

Por su parte, al evaluar las comunidades microbianas de los diferentes tratamientos aplicados al guano (compostaje y digestión anaeróbica), se observaron patrones estructurales que fueron compatibles con el tipo de tratamiento realizado en cada caso; y el análisis de los géneros resultantes en cada tratamiento, contribuye a identificar las ventajas y/o limitaciones de cada uno de ellos.

El tratamiento de los residuos mostró mejorar las condiciones generales de los mismos para ser liberados al ambiente como enmiendas orgánicas. El compost mostró mejores condiciones de estabilidad que el guano y el digerido. Además, tanto el guano crudo como el digestato mostraron valores de pH y CE más altos que el compost, y el digestato presentó los valores más altos de N y P. Por su parte, tanto el guano como el compost mostraron valores de zinc por encima de los límites establecidos.

La realización de compost podría, entonces, disminuir la carga de contaminantes (exceso de nutrientes como N y P, así como la presencia de bacterias patógenas), permitiendo la utilización de los residuos de forma segura, sin poner en riesgo la salud humana, animal ni vegetal, y reduciendo el riesgo de contaminación de napas y cursos de agua, con menor impacto en las comunidades bacterianas de suelos.

Este trabajo es una contribución a retratar las prácticas agrícolas locales actuales en un contexto de escasez de análisis comparativos.

Los sistemas agrícolas tendientes a los principios de la economía circular, que propone gestionar el uso de los residuos como recursos, requieren la cuantificación de las posibles externalidades, provocadas por el uso de enmiendas orgánicas para lograr esta propuesta. Este tipo de estudio debería ayudar a la comprensión de la complejidad del proceso de reutilización de residuos, así como estimular la adopción de comportamientos sustentables y seguros entre las partes interesadas.

# Conclusiones Generales

En el presente trabajo de tesis se realizó un estudio del sistema productivo aviar de la Argentina abordando algunas de las aristas que lo componen, considerando el ambiente productivo, los factores de modulación del mismo y los residuos que genera esta actividad. Se consideraron para dichos análisis, herramientas que recuperan algunos enfoques provenientes de la microbiología, la agronomía y la bioinformática, entendido que su conocimiento podría impactar en mejoras en la sanidad animal, la productividad de las granjas, el manejo de los residuos generados y el impacto ambiental que los mismos producen a lo largo de los ciclos productivos avícolas.

En el capítulo 1 se evaluaron diferentes factores que afectan la microbiota del tracto gastrointestinal de aves de producción, reforzándose el rol de la locación geográfica como modulador de dicha comunidad. Acuñamos el término “microbiota local” y desde este enfoque se describió la microbiota argentina presente en granjas experimentales y comerciales de las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires, principales zonas de producción del país.

En el capítulo 2 se exploraron los efectos de diferentes aditivos en la dieta sobre la microbiota intestinal que son utilizados como promotores de crecimiento, comparando los resultados obtenidos en situaciones experimentales y comerciales. A su vez, se exploraron las comunidades microbianas de las camas de pollo y las diferencias resultantes como consecuencia del uso de aditivos dietarios.

Finalmente, en el capítulo 3 se evaluó el impacto de la utilización de los residuos avícolas en agricultura extensiva, logrando caracterizar los principales problemas de su aplicación de forma directa, es decir sin tratar, ya sea en la comunidad de bacterias del suelo o en los parámetros fisicoquímicos y ecotoxicológicos del mismo. Complementariamente, se caracterizaron las comunidades bacterianas presentes en

enmiendas realizadas a partir del compostaje o digestión anaeróbica de guano de ponedoras, permitiendo valorizar este residuo y logrando que su utilización se realice de forma segura, sin poner en riesgo la salud humana, animal o vegetal.

Como se dijo anteriormente, esta tesis aborda el ciclo productivo completo, considerando parte del mismo a la generación de residuos y su utilización, mediada por una biotransformación, como subproductos de bajo impacto ambiental. La posibilidad de reutilizar los nutrientes, que se encuentran en grandes cantidades en los residuos avícolas, no sólo permite el retorno de los mismos a los suelos sino que implica retos en el desarrollo de agroecosistemas sustentables, que involucren: i) la concientización de productores a la hora de la aplicación de dichos residuos en los suelos, entendiendo el peligro potencial de contaminaciones que pueden suceder dado el exceso de nutrientes, presencia de bacterias patógenas, parásitos u otros componentes químicos como elementos potencialmente tóxicos, insecticidas o medicamentos veterinarios; y ii) regímenes regulatorios que se cumplan en el territorio y que permitan establecer límites claros a la utilización de los residuos crudos, es decir, sin tratamientos previos.

Las demandas tanto de los consumidores como de los ciudadanos, ponen de manifiesto la necesidad de nuevos paradigmas productivos que respondan a sus expectativas en aspectos referidos a la salud, el bienestar animal, el cambio climático o el impacto ambiental de las producciones agropecuarias.

El rol de los profesionales involucrados con el sector agrícola tiene, entonces, una responsabilidad no sólo productiva sino también socioambiental, al tener que dar respuesta tanto a la producción de alimentos y materias primas, como al desarrollo sostenible de los agroecosistemas.

Esta coyuntura representa una oportunidad para el desarrollo de sistemas de producción alternativos que involucren, desde una perspectiva de seguridad alimentaria y compromiso ambiental, por ejemplo el aumento de productores locales, productores orgánicos u otros productos certificados, cada vez más demandados.

Es así que, abordar la problemática ambiental a través de estrategias y políticas de desarrollo sostenible, donde no sólo se tomen medidas dirigidas a maximizar la producción, sino que convierta a los actores involucrados en los principales agentes del cambio, es el camino para lograr sistemas productivos sostenibles, con bajo impacto ambiental y respondiendo a las demandas y necesidades de la sociedad en su conjunto.

# Referencias bibliográficas

- Abdelfattah, A., Malacrinò, A., Wisniewski, M., Cacciola, S.O., Schena, L., 2018. Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biol. Control* 120. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009>
- Agersø, Y., Sandvang, D., 2005. Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in Isolated from Pigsties and Manured Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7941–7947. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7941>
- Alabadan, B. a, Adeoye, P. a, Folorunso, E. a, 2009. Effect of different poultry wastes on physical, chemical and biological properties of soil. *Casp. J. Environ. Sci.* 7, 31–35.
- Albuquerque, J.A., de la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M., Bernal, M.P., 2012. Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy* 40, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.018>
- Allali, I., Arnold, J.W., Roach, J., Cadenas, M.B., Butz, N., Hassan, H.M., Koci, M., Ballou, A., Mendoza, M., Ali, R., Azcarate-Peril, M.A., 2017. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol.* 17, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8>
- Allen, H.K., Levine, U.Y., Looft, T., Bandrick, M., Casey, T.A., 2013. Treatment, promotion, commotion: Antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol.* 21, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.001>
- Almada, N.S., Araujo, S.R., Arias, N.M., Bernigaud, I.C., Bueno, D.J., De Battista, J.J., Duarte, S.L., Federico, F.J., Ferrer, J.L., Gallinger, C.I., Gange, J.M., García, A.L., Genta, G., Procura, F., Pulido, D.G., Ré, A.E., Rodríguez, F.I., Soria, M.A., 2016. Eficiencia del tratamiento de la cama de pollo mediante apilado en granjas comerciales, Cama de pollo en Entre Ríos: Aportes para su uso y manejo. Ediciones INTA, Concepción del Uruguay, ENtre Ríos.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., Vallini, G., 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ. Int.* 33, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.006>
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. The Increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks in associated with weight gain. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010463>
- Arai, Y., Sparks, D.L., 2007. Phosphate Reaction Dynamics in Soils and Soil Components: A Multiscale Approach. *Adv. Agron.* 94, 135–179. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)94003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)94003-6)

- Ashworth, A.J., Chastain, J.P., Moore, P.A., 2020. Nutrient Characteristics of Poultry Manure and Litter. *Anim. Manure Prod. Charact. Environ. Concerns, Manag.* 63–87. <https://doi.org/10.2134/asaspecpub67.c5>
- Bachar, A., Al-Ashhab, A., Soares, M.I.M., Sklarz, M.Y., Angel, R., Ungar, E.D., Gillor, O., 2010. Soil Microbial Abundance and Diversity Along a Low Precipitation Gradient. *Microb. Ecol.* 60, 453–461. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9727-1>
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/membr.00044-16>
- Barth, C.L., 1985. Livestock characterization- A new approach in agricultural waste utilization and management. *Trans. ASAE* 4, 286–291.
- Baurhoo, B., Ferket, P.R., Zhao, X., 2009. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult. Sci.* 88, 2262–2272. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00562>
- Becciu, G., Estévez Magnasco, R.L., 2012. Engorde de pollos parrilleros. Instituto Tecnológico de Buenos Aires.
- Bernal, M.P., Sommer, S.G., Chadwick, D., Qing, C., Guoxue, L., Michel, F.C., 2017. Current Approaches and Future Trends in Compost Quality Criteria for Agronomic, Environmental, and Human Health Benefits, in: *Advances in Agronomy*. pp. 143–233. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.03.002>
- Bhat, A.K., 2013. The Role of Computer in Liquid Chromatography. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7, 981–986. <https://doi.org/10.1246/nikkashi.1986.981>
- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., Leschine, S., 2013. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity* 5, 627–640. <https://doi.org/10.3390/d5030627>
- Biebl, H., Pfennig, N., 1981. Isolation of Members of the Family Rhodospirillaceae, in: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 267–273. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_14)
- Bitsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., Komives, T., 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci.* 231, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.005>
- Bloem, E., Albiñ, A., Elving, J., Hermann, L., Lehmann, L., Sarvi, M., Schaaf, T., Schick, J.,

- Turtola, E., Ylivainio, K., 2017. Contamination of organic nutrient sources with potentially toxic elements, antibiotics and pathogen microorganisms in relation to P fertilizer potential and treatment options for the production of sustainable fertilizers: A review. *Sci. Total Environ.* 607–608, 225–242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.274>
- Braz, G.H.R., Fernandez-Gonzalez, N., Lema, J.M., Carballa, M., 2019. Organic overloading affects the microbial interactions during anaerobic digestion in sewage sludge reactors. *Chemosphere* 222, 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.124>
- Bres, P., Beily, M.E., Young, B.J., Gasulla, J., Butti, M., Crespo, D., Candal, R., Komilis, D., 2018. Performance of semi-continuous anaerobic co-digestion of poultry manure with fruit and vegetable waste and analysis of digestate quality: A bench scale study. *Waste Manag.* 82, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.041>
- Brewer, T.E., Handley, K.M., Carini, P., Gilbert, J.A., Fierer, N., 2016. Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium “*Candidatus Udaeobacter copiosus*.” *Nat. Microbiol.* 2, 16198. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.198>
- Burton, C.H., Turner, C., 2003. *Manure management : treatment strategies for sustainable agriculture*, 2nd ed. ed. Silsoe : Silsoe Research Institute, Bedford, UK.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nMeth.3869>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez Peña, A., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Cardona, F., Andrés-lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., Queipo-ortuño, M.I., 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carvalho Neves, L., Beber de Souza, J., de Souza Vidal, C.M., Herbert, L.T., de Souza, K.V., Geronazzo Martins, K., Young, B.J., 2020. Phytotoxicity indexes and removal of color, COD, phenols and ISA from pulp and paper mill wastewater post-treated by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 202, 110939. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110939>
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., Jukes, H., Liebana, E., Lopez Navas, A., Mackay, D., Magiorakos, A.-P., Moreno Romo, M.A., Moulin, G., Muñoz Madero,

- C., Matias Ferreira Pomba, M.C., Powell, M., Pyörälä, S., Rantala, M., Ruzauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E.J., Törneke, K., van Duijkeren, E., Torren Edo, J., 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>
- Celestina, C., Sale, P.W.G., Hunt, J.R., Tang, C., Franks, A.E., 2019. A single application of fertiliser or manure to a cropping field has limited long-term effects on soil microbial communities. *Soil Res.* 57, 228–238. <https://doi.org/10.1071/SR18215>
- Chen, L., Li, F., Li, W., Ning, Q., Li, J., Zhang, J., Ma, D., Zhang, C., 2020. Organic amendment mitigates the negative impacts of mineral fertilization on bacterial communities in Shajiang black soil. *Appl. Soil Ecol.* 150, 103457. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103457>
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., Yuan, Z., 2014. Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217>
- Choi, J.H., Kim, G.B., Cha, C.J., 2014. Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poult. Sci.* 93, 1942–50. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03974>
- Cincap, 2016. Evolución de la avicultura [WWW Document]. *Cent. Inf. Nutr. la carne pollo*. URL <https://www.cincap.com.ar/evolucion-de-la-avicultura/> (accessed 1.6.21).
- Clarke, S.F., Murphy, E.F., O’Sullivan, O., Ross, R.P., O’Toole, P.W., Shanahan, F., Cotter, P.D., 2013. Targeting the Microbiota to Address Diet-Induced Obesity: A Time Dependent Challenge. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065790>
- Coats, E.R., Ibrahim, I., Briones, A., Brinkman, C.K., 2012. Methane production on thickened, pre-fermented manure. *Bioresour. Technol.* 107, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.077>
- Coleri Cihan, A., Karaca, B., Ozel, B.P., Kilic, T., 2017. Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to Bacillaceae family. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2271-0>
- Coolon, J.D., Jones, K.L., Todd, T.C., Blair, J.M., Herman, M.A., 2013. Long-Term Nitrogen Amendment Alters the Diversity and Assemblage of Soil Bacterial Communities in Tallgrass Prairie. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067884>
- Corpet, D.E., 2000. Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Rev. Médecine Vétérinaire* 151, 99–104. <https://doi.org/https://hal.archives-ouvertes.fr/hal->

00411009

- Craven, S.E., Stern, N.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M., 1999. Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given mucosal starter culture. *Avian Dis.* 43, 484–490. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1592646>
- Cressman, M.D., Yu, Z., Nelson, M.C., Moeller, S.J., Lilburn, M.S., Zerby, H.N., 2010. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76. <https://doi.org/10.1128/AEM.00180-10>
- Dahle, H., Birkeland, N.-K., 2006. *Thermovirga lienii* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1539–1545. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63894-0>
- Daniel, H., Gholami, A.M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., Bohm, C., Wenning, M., Wagner, M., Blaut, M., Schmitt-Kopplin, P., Kuster, B., Haller, D., Clavel, T., 2014. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.* 8, 295–308. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.155>
- Danzeisen, J.L., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Tu, Z.J., Johnson, T.J., 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS One* 6, e27949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027949>
- Das, Suwendu, Jeong, S.T., Das, Subhasis, Kim, P.J., 2017. Composted cattle manure increases microbial activity and soil fertility more than composted swine manure in a submerged rice paddy. *Front. Microbiol.* 8, 1702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01702>
- de Beer, H., Hugo, C.J., Jooste, P.J., Willems, A., Vancanneyt, M., Coenye, T., Vandamme, P.A.R., 2005. *Chryseobacterium vrystaatense* sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2149–2153. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63746-0>
- de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Godinho, K., Schiessl, B., Klein, U., Butty, P., Vallé, M., Marion, H., Shryock, T.R., 2012. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 638–651. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr539>
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzales, L., Tablada, M., Robledo, C.V., 2016. Infostat statistical software package version 2016.
- Diacono, M., Montemurro, F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A

- review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 401–422. <https://doi.org/10.1051/agro/2009040>
- Díaz Carrasco, J., Redondo, L., Redondo, E., Dominguez, J., Chacana, A., Fernandez Miyakawa, M., 2016. Use of Plant Extracts as an Effective Manner to Control *Clostridium perfringens* Induced Necrotic Enteritis in Poultry. *Biomed Res. Int.* Article ID. <https://doi.org/10.1155/2016/3278359>
- Díaz Carrasco, J.M., Redondo, E.A., Pin Viso, N.D., Redondo, L.M., Farber, M.D., Fernández Miyakawa, M.E., 2018. Tannins and Bacitracin Differentially Modulate Gut Microbiota of Broiler Chickens. *Biomed Res. Int.* 2018, 11. <https://doi.org/10.1155/2018/1879168>
- Dibner, J.J., Buttin, P., 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism 1 DESCRIPTION OF PROBLEM Gastrointestinal microbial populations—ubiquitous and heterogeneous—play a complex. *J. Appl. Poult. Res.* 11, 453–463.
- Downard, J.R.E., Falkowski, N.R., Mason, K.L., Muraglia, R., Huffnagle, G.B., 2013. Modulation of Post-Antibiotic Bacterial Community Reassembly and Host Response by *Candida albicans*. *Sci. Rep.* 3. <https://doi.org/10.1038/srep02191>
- Dumas, M.D., Polson, S.W., Ritter, D., Ravel, J., Gelb, J., Morgan, R., Wommack, K.E., 2011. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024785>
- Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Croubels, S., De Baere, S., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Louis, P., Vandamme, P., 2011. Butyrate production in phylogenetically diverse Firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microb. Biotechnol.* 4, 503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00244.x>
- Evanylo, G., Sherony, C., Spargo, J., Starner, D., Brosius, M., Haering, K., 2008. Soil and water environmental effects of fertilizer-, manure-, and compost-based fertility practices in an organic vegetable cropping system. *Agric. Ecosyst. Environ.* 127, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.02.014>
- Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., Aguilera, M., Khanna, S., Gil, A.,

- Edwards, C.A., Doré, J., 2010. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 77–84. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e>
- Fasina, Y.O., Newman, M.M., Stough, J.M., Liles, M.R., 2016. Effect of *Clostridium perfringens* infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of broiler chickens. *Poult. Sci.* 95, 247–260. <https://doi.org/10.3382/ps/pev329>
- Fließbach, A., Oberholzer, H., Gunst, L., 2007. Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* 118, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.05.022>
- Fouhy, F., Clooney, A.G., Stanton, C., Claesson, M.J., Cotter, P.D., 2016. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol.* 16, 13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0738-z>
- Frost, A.J., Woolcock, J.B., 1991. Antibiotics and animal production., in: Woolcock, J.B. (Ed.), *Microbiology of Animals and Animal Products*. Elsevier, New York, pp. 181–194.
- Fuerst, J.A., Sagulenko, E., 2011. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 403–413. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2578>
- García Trevin, O.G., 2015. Un siglo de avicultura en la Argentina. *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 2, 46–48.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* 7, 301–313. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00695.x>
- Godoy-Vitorino, F., Leal, S.J., Díaz, W.A., Rosales, J., Goldfarb, K.C., García-Amado, M.A., Michelangeli, F., Brodie, E.L., Domínguez-Bello, M.G., 2012. Differences in crop bacterial community structure between hoatzins from different geographical locations. *Res. Microbiol.* 163, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.01.001>
- Graf, J., 2014. The Family Rikenellaceae, in: R. Eugene, D.E.F.L. Stephen, S. Erko, T.F. (Ed.), *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 857–859.
- Gronow, S., Welnitz, S., Lapidus, A., Nolan, M., Ivanova, N., Del Rio, T.G., Copeland, A., Chen, F., Tice, H., Pitluck, S., Cheng, J.-F., Saunders, E., Brettin, T., Han, C., Detter, J.C., Bruce, D., Goodwin, L., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C.D., Pati, A., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., Lucas, S., 2009.

- Complete genome sequence of *Veillonella parvula* type strain (Te3T). *Stand. Genomic Sci.* 1, 57–65. <https://doi.org/10.4056/sigs.521107>
- Gupta, R.S., 2000. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 367–402. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00031-0)
- Hakkinen, M., Schneitz, C., 1999. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against *Campylobacter jejuni*. *Br. Poult. Sci.* 40, 619–621. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/00071669986990>
- Hakkinen, M., Schneitz, C., 1996. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against a chicken pathogenic *Escherichia coli* and *E coli* O157:H7. *Vet. Rec.* 139, 139–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1136/vr.139.6.139>
- Hallberg, K.B., González-Toril, E., Johnson, D.B., 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14, 9–19. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0282-y>
- Han, G.G., Kim, E.B., Lee, J., Lee, J.-Y., Jin, G., Park, J., Huh, C.-S., Kwon, I.-K., Kil, D.Y., Choi, Y.-J., Kong, C., 2016. Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *Springerplus*. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2604-8>
- Hanada, S., Sekiguchi, Y., 2014. The phylum Gemmatimonadetes, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., F., T. (Eds.), *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea*. pp. 1–1028. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2>
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *R. Soc.* 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Heckrath, G., Brookes, P.C., Poulton, P.R., Goulding, K.W.T., 1995. Phosphorus Leaching from Soils Containing Different Phosphorus Concentrations in the Broadbalk Experiment. *J. Environ. Qual.* 24, 904–910. <https://doi.org/10.2134/jeq1995.00472425002400050018x>
- Hernández, T., Chocano, C., Moreno, J.L., García, C., 2016. Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops-Effects on soil and plant. *Soil Tillage Res.* 160, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.02.005>
- Hird, S.M., Carstens, B.C., Cardiff, S.W., Dittmann, D.L., Brumfield, R.T., 2014. Sampling locality is more detectable than taxonomy or ecology in the gut microbiota of the brood-parasitic Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*). *PeerJ* 2, e321. <https://doi.org/10.7717/peerj.321>
- Hu, Y., Cheng, H., Tao, S., 2017. Environmental and human health challenges of industrial

- livestock and poultry farming in China and their mitigation. *Environ. Int.* 107, 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.07.003>
- Huang, Z., Zhao, F., Li, Y., Zhang, J., Feng, Y., 2017. Variations in the bacterial community compositions at different sites in the tomb of Emperor Yang of the Sui Dynasty. *Microbiol. Res.* 196, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.004>
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., Immerseel, F. Van, 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>
- Iannotti, D.A., Pang, T., Toth, B.L., Elwell, D.L., Keener, H.M., 1993. A quantitative respirometric method for monitoring compost stability. *Compost Sci. Util.* 1, 52–65. <https://doi.org/10.1080/1065657X.1993.10757890>
- Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M., 2010. Microbes in Aerobic and Anaerobic Waste Treatment, in: Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (Eds.), *Microbes at Work: From Wastes to Resources*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–34. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04043-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04043-6_1)
- Irisarri, M., 2013. Manejo y tratamiento de camas en producción avícola [WWW Document]. URL <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/manejo-tratamiento-camas-produccion-t30517.htm> (accessed 7.4.18).
- Jami, E., White, B.A., Mizrahi, I., 2014. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085423>
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719>
- Kabir, S.M.L., 2009. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3531–3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>
- Kaldhusdal, M., Schneitz, C., Hofshagen, M., Skjerve, E., 2001. Reduced incidence of *Clostridium perfringens* - associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Dis.* 45, 149–156. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1593022>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kennedy, A.C., Smith, K.L., 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural

- soils. *Plant Soil* 170, 75–86. <https://doi.org/http://www.jstor.org/stable/42947361>
- Kennedy, N.A., Walker, A.W., Berry, S.H., Duncan, S.H., Farquarson, F.M., Louis, P., Thomson, J.M., Satsangi, J., Flint, H.J., Parkhill, J., Lees, C.W., Hold, G.L., 2014. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* 9, e88982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088982>
- Kien, C.L., Blauwiel, R., Bunn, J.Y., Jetton, T.L., Frankel, W.L., Holst, J.J., 2007. Cecal Infusion of Butyrate Increases Intestinal Cell Proliferation in Piglets. *J. Nutr.* 137, 916–922.
- Kohl, K.D., 2012. Diversity and function of the avian gut microbiota. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 591–602. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0645-z>
- Kollarcikova, M., Faldynova, M., Matiasovicova, J., Jahodarova, E., Kubasova, T., Seidlerova, Z., Babak, V., Videnska, P., Cizek, A., Rychlik, I., 2020. Different bacteroides species colonise human and chicken intestinal tract. *Microorganisms* 8, 1483. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101483>
- Kolton, M., Sela, N., Elad, Y., Cytryn, E., 2013. Comparative Genomic Analysis Indicates that Niche Adaptation of Terrestrial Flavobacteria Is Strongly Linked to Plant Glycan Metabolism. *PLoS One* 8, e76704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076704>
- Komilis, D.P., Tziouvaras, I.S., 2009. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Manag.* 29, 1504–1513. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.10.016>
- Körner, I., Stegmann, R., 2002. N-Dynamics During Composting — Overview and Experimental Results, in: Insam, H., Riddech, N., Klammer, S. (Eds.), *Microbiology of Composting*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4\\_12](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4_12)
- Krause, L., Diaz, N.N., Edwards, R.A., Gartemann, K.H., Krömeke, H., Neuweger, H., Pühler, A., Runte, K.J., Schlüter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Goesmann, A., 2008. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotechnol.* 136, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.06.003>
- Kress, J., Erickson, D.L., 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS* 105, 2761–2762. <https://doi.org/www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0800476105>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W.A., González, A., Caporaso, J.G., Knight, R., 2012. Using QIIME to analyze 16s rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Chapter 10, 1–20. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Kumar, S., 2011. Composting of municipal solid waste. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 112–136.

- <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.492207>
- Kymäläinen, M., Lähde, K., Arnold, M., Kurola, J.M., Romantschuk, M., Kautola, H., 2012. Biogasification of biowaste and sewage sludge - Measurement of biogas quality. *J. Environ. Manage.* 95, S122–S127. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.003>
- Lan, P.T.N., Sakamoto, M., Sakata, S., Benno, Y., 2006. *Bacteriodes barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2853–2859. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64517-0>
- Lange, V., Böhme, I., Hofmann, J., Lang, K., Sauter, J., Schöne, B., Paul, P., Albrecht, V., Andreas, J.M., Baier, D.M., Nething, J., Ehninger, U., Schwarzelt, C., Pingel, J., Ehninger, G., Schmidt, A.H., 2014. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-63>
- Law, J.W.-F., Pusparajah, P., Mutalib, N.-S.A., Wong, S.H., Goh, B.-H., Lee, L.-H., 2019. A review on Mangrove Actinobacterial diversity: the roles of *Streptomyces* and novel species discovery. *Prog. Microbes Mol. Biol.* 2, a0000024. <https://doi.org/https://doi.org/10.36877/pmb.a0000024>
- Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, Y.K., 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 157, 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.07.004>
- León-Sobrino, C., Ramond, J.B., Maggs-Kölling, G., Cowan, D.A., 2019. Nutrient acquisition, rather than stress response over diel cycles, drives microbial transcription in a hyper-arid Namib desert soil. *Front. Microbiol.* 10, 1054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01054>
- Lin, J., Hunkapiller, A.A., Layton, A.C., Chang, Y.-J., Robbins, K.R., 2013. Response of Intestinal Microbiota to Antibiotic Growth Promoters in Chickens. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1348>
- Lloyd, A.B., Cumming, R.B., Kent, R.D., 1977. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust. Vet. J.* 53, 82–87.
- Looney, W.J., Narita, M., Mühlemann, K., 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect. Dis.* 9, 312–323. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0)
- Lopetuso, L.R., Scaldaferrri, F., Petito, V., Gasbarrini, A., 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-23>
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Lu, J., Hofacre, C., Smith, F., Lee, M.D., 2008. Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. *Animal* 2, 669–676. <https://doi.org/10.1017/S1751731108001894>
- Luo, J., Tao, Q., Jupa, R., Liu, Y., Wu, K., Song, Y., Li, J., Huang, Y., Zou, L., Liang, Y., Li, T., 2019. Role of Vertical Transmission of Shoot Endophytes in Root-Associated Microbiome Assembly and Heavy Metal Hyperaccumulation in *Sedum alfredii*. *Environ. Sci. Technol.* 53, 6954–6963. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01093>
- MAGyP, 2021. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca [WWW Document]. URL <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/> (accessed 7.1.21).
- MAGyP, M. de A., 2009. Manual de Avicultura.
- MAGyP, M. de A.G. y P., 2020. Relevamiento Integral de Granjas de Pollos Parrilleros - Informe preliminar Diciembre 2020.
- Maisonnave, R., Lamelas, K., Mair, G., 2015. Buenas Prácticas de Manejo y Utilización de Cama de Pollo y Guano. *Secr. Agric. Ganad. y Pesca. Minist. agroindustria. Pres. la nación.* 43.
- Maisonnave, R., Lamelas, K., Mair, G., Rodríguez, N., 2018. Guano de gallina. *Valor agronómico* 37.
- Mandal, S., Treuren, W. Van, White, R.A., Eggesbø, M., Knight, R., Peddada, S.D., 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>
- Manteca, A., Sanchez, J., 2009. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2920–2924. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-08>
- Mao, H., Wang, K., Wang, Z., Peng, J., Ren, N., 2020. Metabolic function, trophic mode, organics degradation ability and influence factor of bacterial and fungal communities in chicken manure composting. *Bioresour. Technol.* 302, 122883. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122883>
- Marshall, B.M., Levy, S.B., 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Mendoza Vargas, H., 2013. Estudios de la geografía humana de México, Instituto de Geografía.
- Menichelli, M., Gallard, E., Revidatti, F., Fernández, R., 2015. Validación de instalaciones, equipos y metodologías de manejo en la producción avícola zonal. *Voces y Ecos* 33, 57–59.
- Mohd Shaufi, M.A., Sieo, C.C., Chong, C.W., Gan, H.M., Ho, Y.W., 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog.* 7. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0051-7>

- Moore, P.R., Evenson, A., Luckey, T.D., McCoy, E., Elvehjem, C.A., Hart, E.B., 1946. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.* 165, 437–441. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41154-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41154-9)
- Morrison, J.M., Murphy, C.L., Baker, K., Zamor, R.M., Nikolai, S.J., Wilder, S., Elshahed, M.S., Youssef, N.H., 2017. Microbial communities mediating algal detritus turnover under anaerobic conditions, *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2803>
- Motta, H., 2017. Repaso histórico de la avicultura argentina. [WWW Document]. URL <https://paralelo32.com.ar/repaso-historico-de-la-avicultura-argentina/> (accessed 1.6.21).
- Mufwanzala, N., Dikinya, O., 2010. Impact of poultry manure and its associated salinity on the growth and yield of spinach (*Spinacea oleracea*) and carrot (*Daucus carota*). *Int. J. Agric. Biol.* 12, 489–494. <https://doi.org/10-062/MFA/2010/12-4-489-494>
- Muhammad, J., Khan, S., Lei, M., Khan, M.A., Nawab, J., Rashid, A., Ullah, S., Khisro, S.B., 2020. Application of poultry manure in agriculture fields leads to food plant contamination with potentially toxic elements and causes health risk. *Environ. Technol. Innov.* 19, 100909. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100909>
- Nava, G.M., Attene-Ramos, M.S., Gaskins, H.R., Richards, J.D., 2009. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Vet. Microbiol.* 137, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.037>
- Navarrete, A.A., Venturini, A.M., Meyer, K.M., Klein, A.M., Tiedje, J.M., Bohannon, B.J., Nüsslein, K., Tsai, S.M., Rodrigues, J.L.M., 2015. Differential response of Acidobacteria subgroups to forest-to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. *Front. Microbiol.* 6, 1443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01443>
- Neina, D., 2019. The Role of Soil pH in Plant Nutrition and Soil Remediation. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5794869>
- Neumann, A.P., Suen, G., 2015. Differences in major bacterial populations in the intestines of mature broilers after feeding virginiamycin or bacitracin methylene disalicylate. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.12960>
- Nosanchuk, J.D., Lin, J., Hunter, R.P., Aminov, R.I., 2014. Low-dose antibiotics: current status and outlook for the future. *Front. Microbiol.* 5, 478. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00478>
- Nurmi, E., Rantala, M., 1973. New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature* 241, 210–211. <https://doi.org/10.1038/241210a0>
- Oakley, Brian B, Buhr, R.J., Ritz, C.W., Kiepper, B.H., Berrang, M.E., Seal, B.S., Cox, N.A., 2014. Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. *BMC Vet. Res.* 10, 282.

- <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0282-8>
- Oakley, Brian B., Lillehoj, H.S., Kogut, M.H., Kim, W.K., Maurer, J.J., Pedroso, A., Lee, M.D., Collett, S.R., Johnson, T.J., Cox, N.A., 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 360, 100–112. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608>
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. Package “vegan”. *Community Ecology Package*.
- Oladipupo, A.J., Alade, A.A., Adewuyi, S., Ajiboye, G.A., Toyin Blessing, O., 2020. Soil Phosphorus Fractions, Reaction, and Conductivity in Some Southwestern Nigerian Soils as Affected by Animal Manure Mixtures. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 51, 2616–2632. <https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1845362>
- Ouyang, W.Y., Su, J.Q., Richnow, H.H., Adrian, L., 2019. Identification of dominant sulfamethoxazole-degraders in pig farm-impacted soil by DNA and protein stable isotope probing. *Environ. Int.* 126, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.001>
- Pan, D., Yu, Z., 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* 5, 108–119. <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30, 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Romantschuk, M., 2010. Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol.* 10. <https://doi.org/http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/94>
- Patiño-torres, C.O., Sanclemente-Reyes, O.E., 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado* 10, 288–297.
- Pivnick, H., Nurmi, E., 1982. The Nurmi concept and its role in the control of salmonellae in poultry, in: Davies, R. (Ed.), *Developments in Food Microbiology*, Vol. 1. Applied Science Publishers, London, pp. 41–70.
- Pizarro, M.D., Céccoli, G., Muñoz, F.F., Frizzo, L.S., Daurelio, L.D., Bouzo, C.A., 2019. Use of raw and composted poultry litter in lettuce produced under field conditions: microbiological quality and safety assessment. *Poult. Sci.* 98, 2608–2614. <https://doi.org/10.3382/ps/pez005>
- Plan Mapa de Suelos, 1998. *Carta de Suelos de la República Argentina*.
- Poirier, S., Bize, A., Bureau, C., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Community shifts within anaerobic digestion microbiota facing phenol inhibition: Towards early warning microbial

- indicators? *Water Res.* 100, 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.041>
- Pourabedin, M., Guan, L., Zhao, X., 2015. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome* 3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0079-4>
- Pretty, J., Bharucha, Z.P., 2014. Sustainable intensification in agricultural systems. *Ann. Bot.* 114, 1571–1596. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu205>
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5, e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Qin, M., Shi, G., Zhang, Q., Meng, Y., Liu, Y., Pan, J., Jiang, S., Zhou, G., Feng, H., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi serve as keystone taxa for revegetation on the Tibetan Plateau. *J. Basic Microbiol.* 59, 609–620. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900060>
- Ramirez, K.S., Lauber, C.L., Knight, R., Bradford, M.A., Fierer, N., 2010. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology* 91, 3463–3470.
- Ravindran, B., Mupambwa, H.A., Silwana, S., Mnkeni, P.N.S., 2017. Assessment of nutrient quality, heavy metals and phytotoxic properties of chicken manure on selected commercial vegetable crops. *Heliyon* 3, e00493. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00493>
- Redondo, L.M., Chacana, P.A., Dominguez, J.E., Fernandez Miyakawa, M.E., 2014. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Front. Microbiol.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00118>
- Rehman, H.U., Vahjen, W., Awad, W.A., Zentek, J., 2007. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 61, 319–335. <https://doi.org/10.1080/17450390701556817>
- Richards, J.D., Gong, J., de Lange, C.F.M., 2005. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 421–435.
- Rinttilä, T., Apajalahti, J., 2013. Intestinal microbiota and metabolites - Implications for broiler chicken health and performance. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 647–658. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00742>
- Ritari, J., Koskinen, K., Hultman, J., Kurola, J.M., Kymäläinen, M., Romantschuk, M., Paulin, L., Auvinen, P., 2012. Molecular analysis of meso- and thermophilic microbiota associated with anaerobic biowaste degradation. *BMC Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-121>
- Rizzo, P.F., 2020. Análisis integral para el manejo del guano de aves ponedoras: caracterización,

- bioestabilización y valorización de los productos generados. Universidad de Buenos Aires.
- Rizzo, P.F., Bres, P.A., Young, B.J., Zubillaga, M.S., Riera, N.I., Beily, M.E., Argüello, A., Crespo, D.C., Sánchez, A., Komilis, D., 2020. Temporal variation of physico-chemical, microbiological, and parasitological properties of poultry manure from two egg production systems. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 22, 1140–1151. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01008-3>
- Rizzo, P.F., Torre, V. Della, Riera, N.I., Crespo, D., Barrena, R., Sánchez, A., 2013. Co-composting of poultry manure with other agricultural wastes: process performance and compost horticultural use. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 17, 42–50. <https://doi.org/10.1007/s10163-013-0221-y>
- Rolfe, R., 1991. Population dynamics of the intestinal tract, in: Blankenship, L. (Ed.), *Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 58–75.
- Román, P., Martínez, M.M., Pantoja, A., 2013. *Manual de compostaje del agricultor. Experiencias en América Latina.*, Organizaci. ed, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. FAO.
- Rychlik, I., 2020. Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals* 10. <https://doi.org/10.3390/ani10010103>
- SAGyP, AACS, 2004. SAMLA. Recopilación de técnicas de laboratorio. Sistema de apoyo metodológico a los laboratorios de análisis de suelos, agua, vegetales y enmiendas orgánicas.
- Santi, C., Bogusz, D., Franche, C., 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111, 743–767. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>
- Saxena, S., Saxena, V.K., Tomar, S., Sapkota, D., Gonmei, G., 2016. Characterization of Caecum and Crop Microbiota of Indian Indigenous Chicken Targeting Multiple Hypervariable Regions within 16S rRNA gene. *Br. Poult. Sci.* 57, 381–389. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1161728>
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Horn, D.J. Van, Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- SCyMA, 2019. Resolución 19/19. Norma Técnica para la Aplicación Agrícola de Digerido Proveniente de Plantas de Digestión Anaeróbica. [WWW Document]. URL <http://argentinambiental.com/legislacion/nacional/>

- SCyMA, SENASA, 2019. Resolución Conjunta 1/19. Marco Normativo para la Producción, Registro y Aplicación de Compost. [WWW Document]. URL <https://argentina.gob.ar/normativa/nacional/resolución-1-2019-%0A318692/texto>
- Seal, B.S., Lillehoj, H.S., Donovan, D.M., Gay, C.G., 2013. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim. Health Res. Rev.* 14, 78–87. <https://doi.org/10.1017/S1466252313000030>
- Sepulcri, M.G., Palacios, D., Magri, L.I., Barbano, P.M., 2018. Survey of the poultry activity in the northern territory of the Metropolitan Area of Buenos Aires. *Rev. Investig. Agropecu.* 44, 80–87.
- Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B., Kim, W.K., 2018. Chicken gut microbiota: Importance and detection technology. *Front. Vet. Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00254>
- Simonetti, E., Pin Viso, N., Montecchia, M., Zilli, C., Balestrasse, K., Carmona, M., 2015. Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. *Microbiol. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.004>
- Singh, K.M., Shah, T., Deshpande, S., Jakhesara, S.J., Koringa, P.G., Rank, D.N., Joshi, C.G., 2012. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Mol. Biol. Rep.* 39, 10595–10602. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1947-7>
- Singh, P., Karimi, A., Devendra, K., Waldroup, P.W., Cho, K.K., Kwon, Y.M., 2013. Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens Pallavi. *Poult. Sci.* 92, 272–276. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02603>
- Stanley, D., Denman, S.E., Hughes, R.J., Geier, M.S., Crowley, T.M., Chen, H., Haring, V.R., Moore, R.J., 2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3847-5>
- Stanley, D., Geier, M.S., Chen, H., Hughes, R.J., Moore, R.J., 2015. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0388-6>
- Stanley, D., Geier, M.S., Denman, S.E., Haring, V.R., Crowley, T.M., Hughes, R.J., Moore, R.J., 2013. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Vet. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.030>
- Stanley, D., Hughes, R.J., Geier, M.S., Moore, R.J., 2016. Bacteria within the Gastrointestinal Tract Microbiota Correlated with Improved Growth and Feed Conversion: Challenges Presented for the Identification of Performance Enhancing Probiotic Bacteria. *Front. Microbiol.* 7.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00187>
- Stanley, D., Hughes, R.J., Moore, R.J., 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>
- Stavric, S., Buchanan, B., Gleeson, T.M., 1992. Competitive exclusion of *Escherichia coli* O157:H7 from chicks with anaerobic cultures of faecal microflora. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 191–193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00682.x>
- Stern, N.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M.E., Musgrove, M.T., 2001. Comparison of Mucosal Competitive Exclusion and Competitive Exclusion Treatment to Reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. Colonization in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 80, 156–160. <https://doi.org/10.1093/ps/80.2.156>
- Sun, R., Zhang, X.X., Guo, X., Wang, D., Chu, H., 2015. Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw. *Soil Biol. Biochem.* 88, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.007>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21, 2045–2050. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., 2000. Fate of nitrogen during composting of chicken litter. *Environ. Pollut.* 110, 535–541. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00319-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00319-X)
- Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., Hodgkiss, I.J., 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* 93, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00052-8)
- Torok, V.A., Allison, G.E., Percy, N.J., Ophel-Keller, K., Hughes, R.J., 2011a. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3380–3390. <https://doi.org/10.1128/AEM.02300-10>
- Torok, V.A., Hughes, R.J., Mikkelsen, L.L., Perez-Maldonado, R., Balding, K., MacAlpine, R., Percy, N.J., Ophel-Keller, K., 2011b. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.00165-11>
- Torok, V.A., Hughes, R.J., Ophel-Keller, K., Ali, M., MacAlpine, R., 2009. Influence of different

- litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 88, 2474–2481.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Urta, J., Alkorta, I., Lanzén, A., Mijangos, I., Garbisu, C., 2019. The application of fresh and composted horse and chicken manure affects soil quality, microbial composition and antibiotic resistance. *Appl. Soil Ecol.* 135, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.11.005>
- USDA, U.S.D. of A., USCC, U.S.C.C., 2001. Test methods for the examination of composting and compost, in: Thomson, W. (Ed. -i.-C. (Ed.)), *The Composting Council Research and Education Foundation*. Holbrook, New York, pp. 03.09.1–03.09.4.
- van Bruggen, A.H.C., Goss, E.M., Havelaar, A., van Diepeningen, A.D., Finckh, M.R., Morris, J.G., 2019. One Health - Cycling of diverse microbial communities as a connecting force for soil, plant, animal, human and ecosystem health. *Sci. Total Environ.* 664, 927–937. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.091>
- Van Der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., Van Knapen, F., Biesterveld, S., 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb. Ecol.* 44, 286–293. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2015-y>
- Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult. Sci.* 84, 1851–1856. <https://doi.org/10.1093/ps/84.12.1851>
- Verstegen, M.W.A., Williams, B.A., 2002. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim. Biotechnol.* 13, 113–127. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005774>
- Videnska, P., Rahman, M.M., Faldynova, M., Babak, V., Matulova, M.E., Prukner-Radovic, E., Krizek, I., Smole-Mozina, S., Kovac, J., Szmolka, A., Nagy, B., Sedlar, K., Cejkova, D., Rychlik, I., 2014. Characterization of egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia. *PLoS One* 9, e110076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110076>
- Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C., Brenes, A., 2011. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult. Sci.* 90, 566–578. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00889>
- Vreeland, R.H., 1992. The Family Halomonadaceae, in: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M.,

- Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer New York, New York, NY, pp. 3181–3188. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_5)
- Wagg, C., Schlaeppli, K., Banerjee, S., Kuramae, E.E., van der Heijden, M.G.A., 2019. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. *Nat. Commun.* 10, 4841. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12798-y>
- Waite, D.W., Taylor, M.W., 2014. Characterizing the avian gut microbiota: Membership, driving influences, and potential function. *Front. Microbiol.* 5, 223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00223>
- Waldrip, H.M., He, Z., Erich, M.S., 2011. Effects of poultry manure amendment on phosphorus uptake by ryegrass, soil phosphorus fractions and phosphatase activity. *Biol. Fertil. Soils* 47, 407–418. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0546-4>
- Walker, A.W., Martin, J.C., Scott, P., Parkhill, J., Flint, H.J., Scott, K.P., 2015. 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiome* 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0087-4>
- Wang, L., Lilburn, M., Yu, Z., 2016. Intestinal Microbiota of Broiler Chickens As Affected by Litter Management Regimens. *Front. Microbiol.* 7, 593.
- Wang, X., Li, Q., Sui, J., Zhang, J., Liu, Z., Du, J., Xu, R., Zhou, Y., Liu, X., 2019. Isolation and characterization of antagonistic bacteria *paenibacillus jamilae* HS-26 and their effects on plant growth. *Biomed Res. Int.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3638926>
- Wei, S., Morrison, M., Yu, Z., 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult. Sci.* 92, 671–683. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02822>
- Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E.R., Knight, R., 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Wexler, H.M., 2007. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Perspective Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS* 95, 6578–6583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Whitman, W.B., Suzuki, K., 2015. Solirubrobacteraceae. *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.* 1–2. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00055>
- Witzig, M., Da Silva, A.C., Gree-Engert, R., Hoelzle, K., Zeller, E., Seifert, J., Hoelzle, L.E.,

- Rodehutsord, M., 2015. Spatial variation of the gut microbiota in broiler chickens as affected by dietary available phosphorus and assessed by T-RFLP analysis and 454 pyrosequencing. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143442>
- World Health Organization (WHO), 2017. One health [WWW Document].
- Yang, C., Chowdhury, M.A.K., Hou, Y., Gong, J., 2015. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. *Pathogens* 4, 137–156. <https://doi.org/10.3390/pathogens4010137>
- Yang, Q., Ren, S., Niu, T., Guo, Y., Qi, S., Han, X., Liu, D., Pan, F., 2013. Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 1231–1241. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1994-1>
- Yang, S.J., Kang, I., Cho, J.C., 2016. Expansion of cultured bacterial diversity by large-scale dilution-to-extinction culturing from a single seawater sample. *Microb. Ecol.* 71, 29–43. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0695-3>
- Yang, Y., Ashworth, A.J., Willett, C., Cook, K., Upadhyay, A., Owens, P.R., Ricke, S.C., DeBruyn, J.M., Moore, P.A., 2019. Review of Antibiotic Resistance, Ecology, Dissemination, and Mitigation in U.S. Broiler Poultry Systems. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02639>
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–228. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Yin, C., Jones, K.L., Peterson, D.E., Garrett, K.A., Hulbert, S.H., Paulitz, T.C., 2010. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2111–2118. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.006>
- Young, B.J., Riera, N.I., Beily, M.E., Bres, P.A., Crespo, D.C., Ronco, A.E., 2012. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019>
- Young, B.J., Rizzo, P.F., Riera, N.I., Della Torre, V., López, V.A., Molina, C.D., Fernández, F.E., Crespo, D.C., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A., 2016. Development of phytotoxicity indexes and their correlation with ecotoxicological, stability and physicochemical parameters during passive composting of poultry manure. *Waste Manag.* 54, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.001>
- Yu, D., 2014. Microbial Community Profiling of Biodegradable Municipal Solid Waste Treatments

- Aerobic Composting and Anaerobic Digestion.

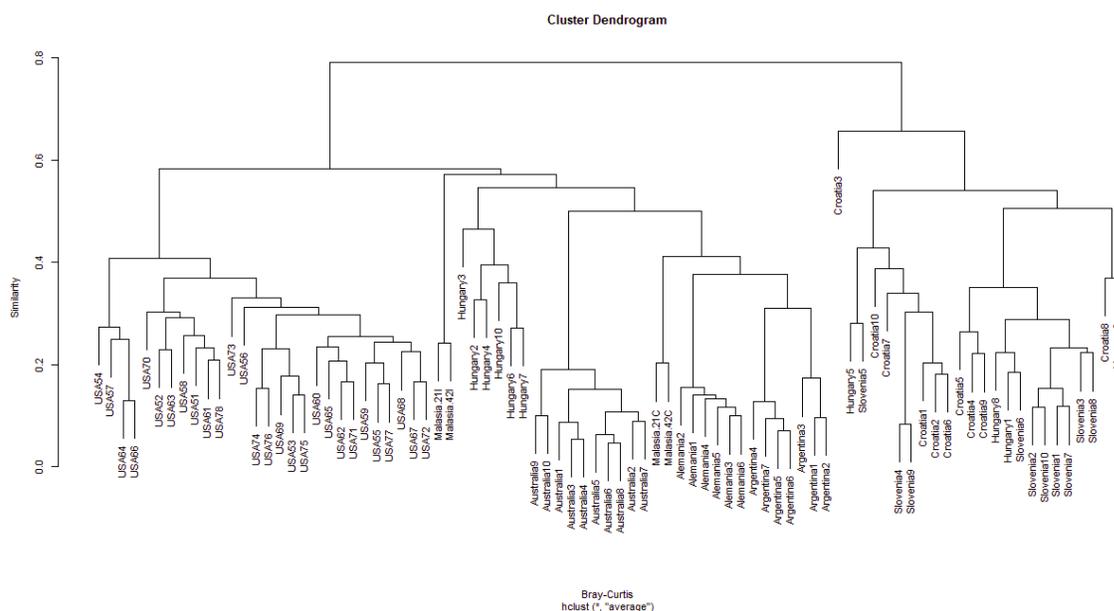
- Yuan, H., Ge, T., Zhou, P., Liu, S., Roberts, P., Zhu, H., Zou, Z., Tong, C., Wu, J., 2013. Soil microbial biomass and bacterial and fungal community structures responses to long-term fertilization in paddy soils. *J. Soils Sediments* 13, 877–886. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0664-8>
- Yuan, Z.H., Wang, J.P., Zhang, K.Y., Ding, X.M., Bai, S.P., Zeng, Q.F., Xuan, Y., Su, Z.W., 2016. Effect of Vanadium and Tea Polyphenols on Intestinal Morphology, Microflora and Short-Chain Fatty Acid Profile of Laying Hens. *Biol. Trace Elem. Res.* 174, 419–427. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0721-4>
- Zakka, U., Atijegbe, S., Lale, N., Kalu, E., 2016. Effects of Poultry Manure and NPK Fertilizer on Infestation of Musk Pumpkin (*Cucurbita maxima*) by Insect Pests. *Int. J. Plant Soil Sci.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2016/13257>
- Zhang, M., Riaz, M., Liu, B., Xia, H., El-desouki, Z., Jiang, C., 2020. Two-year study of biochar: Achieving excellent capability of potassium supply via alter clay mineral composition and potassium-dissolving bacteria activity. *Sci. Total Environ.* 717, 137286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137286>
- Zhang, M., Riaz, M., Zhang, L., El-Desouki, Z., Jiang, C., 2019. Biochar induces changes to basic soil properties and bacterial communities of different soils to varying degrees at 25 mm rainfall: More effective on acidic soils. *Front. Microbiol.* 10, 1321. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01321>
- Zhao, J., Ni, T., Li, Y., Xiong, W., Ran, W., Shen, B., Shen, Q., Zhang, R., 2014. Responses of Bacterial Communities in Arable Soils in a Rice-Wheat Cropping System to Different Fertilizer Regimes and Sampling Times. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085301>
- Zhao, W., Wang, Y., Liu, S., Huang, J., Zhai, Z., He, C., Ding, J., Wang, J., Wang, H., Fan, W., Zhao, J., Meng, H., 2015. The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117441>
- Zhou, H., Brown, R.C., Wen, Z., 2019. Anaerobic digestion of aqueous phase from pyrolysis of biomass: Reducing toxicity and improving microbial tolerance. *Bioresour. Technol.* 292, 121976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121976>
- Zhou, X., Jiang, X., Yang, C., Ma, B., Lei, C., Xu, C., Zhang, A., Yang, X., Xiong, Q., Zhang, P., Men, S., Xiang, R., Wang, H., 2016. Cecal microbiota of Tibetan Chickens from five geographic regions were determined by 16S rRNA sequencing. *Microbiologyopen* 5, 753–

762. <https://doi.org/10.1002/mbo3.367>

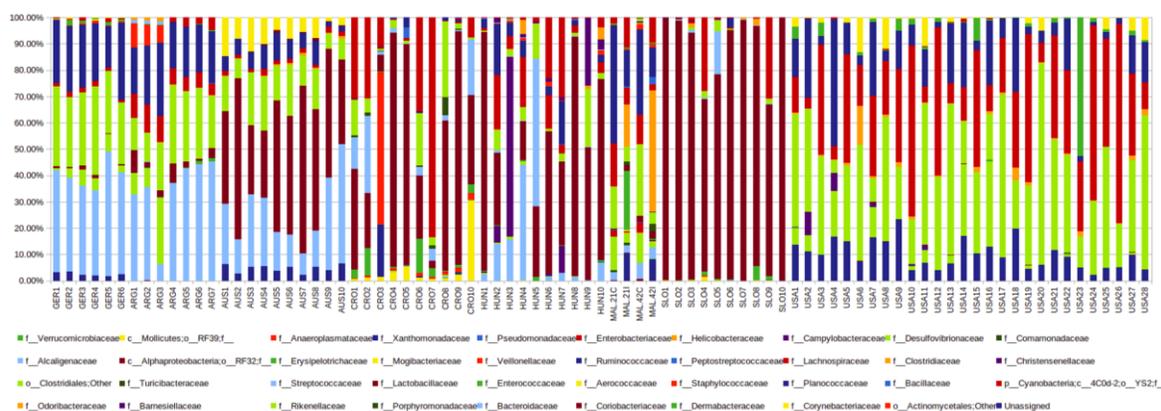
Zhu, J., Li, M., Whelan, M., 2018. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Sci. Total Environ.* 612, 522–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54–57.

# Apéndice



**Apéndice 1.1. Análisis de agrupamiento (clustering) de las comunidades microbianas del TGI de pollos a nivel de género, basado en la disimilitud de Bray-Curtis, para las diferentes locaciones geográficas resultado del análisis abierto u “open reference”.**



**Apéndice 1.2. Abundancia relativa de las bacterias clasificadas a nivel familia de muestras de diferentes países resultado del análisis abierto u “open reference”.** Las muestras de TGI de pollos evaluadas de las diferentes locaciones geográficas fueron designadas como AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malasia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos. La clasificación taxonómica está expresada como: c\_clase, o\_orden y f\_familia.

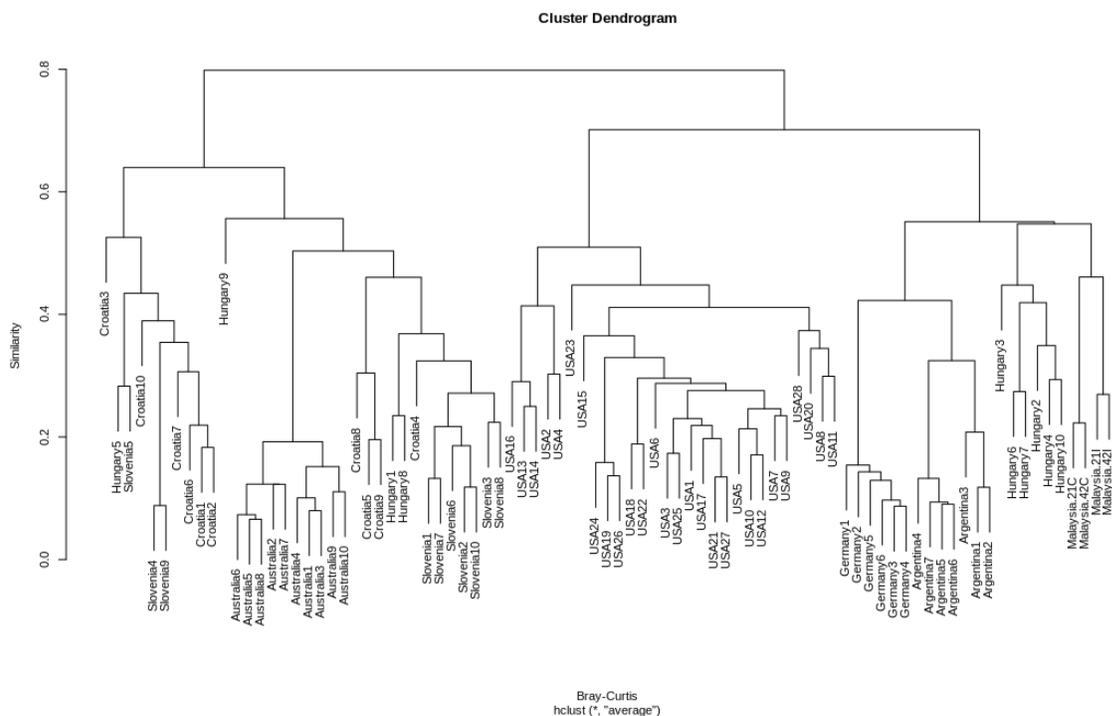
**Apéndice 1.3. Análisis estadístico de las abundancias relativas de las familias predominantes en el TGI de pollos, resultado del análisis abierto u “open reference”.** Las diferentes locaciones geográficas evaluadas fueron designadas como AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malaysia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos.

Filo	Clase	Orden	Familia	ARG	AUS	CRO	GER	HUN	MAL	SLO	USA
Firmicutes				56,43 <sup>c</sup>	65,35 <sup>bc</sup>	74,04 <sup>abc</sup>	54,81 <sup>c</sup>	71,20 <sup>bc</sup>	74,70 <sup>abc</sup>	93,53 <sup>a</sup>	82,00 <sup>ab</sup>
	Clostridia			51,88 <sup>b</sup>	21,95 <sup>c</sup>	8,37 <sup>c</sup>	53,04 <sup>b</sup>	19,44 <sup>c</sup>	65,29 <sup>ab</sup>	2,20 <sup>d</sup>	78,54 <sup>a</sup>
		Clostridiales		51,88 <sup>b</sup>	21,95 <sup>c</sup>	8,37 <sup>c</sup>	53,04 <sup>b</sup>	19,44 <sup>c</sup>	65,29 <sup>ab</sup>	2,20 <sup>d</sup>	78,54 <sup>a</sup>
			Ruminococcaceae	20,31 <sup>a</sup>	6,39 <sup>bc</sup>	0,29 <sup>c</sup>	23,40 <sup>a</sup>	5,88 <sup>bc</sup>	25,48 <sup>a</sup>	0,45 <sup>c</sup>	12,89 <sup>ab</sup>
			Lachnospiraceae	7,35	1,67	0,26	1,44	6,88	9,12	0,15	30,20 <sup>a</sup>
			Veillonelaceae	3,40 <sup>a</sup>	0	0,01	0,36	0,63	0,97	0,02	0
			Clostridiaceae	0,11	0,52	0,02	0,03	0,21	15,71 <sup>a</sup>	0,56	1,45
	Bacilli			4,39 <sup>d</sup>	43,40 <sup>c</sup>	65,66 <sup>b</sup>	0,83 <sup>d</sup>	51,75 <sup>bc</sup>	9,01 <sup>d</sup>	91,32 <sup>a</sup>	0,13 <sup>d</sup>
		Lactobacillales		4,39 <sup>d</sup>	43,40 <sup>c</sup>	55,64 <sup>b</sup>	0,83 <sup>d</sup>	51,69 <sup>bc</sup>	7,84 <sup>d</sup>	91,24 <sup>a</sup>	0,13 <sup>d</sup>
			Lactobacillaceae	3,93 <sup>d</sup>	43,40 <sup>c</sup>	44,47 <sup>b</sup>	0,83 <sup>d</sup>	45,67 <sup>bc</sup>	2,00 <sup>d</sup>	88,49 <sup>a</sup>	0,05 <sup>d</sup>
Bacteroidetes				40,66 <sup>a</sup>	21,92 <sup>b</sup>	0,21 <sup>c</sup>	41,79 <sup>a</sup>	17,89 <sup>b</sup>	12,15 <sup>bc</sup>	0,05 <sup>c</sup>	5,15 <sup>c</sup>
	Bacteroidia			40,66 <sup>a</sup>	21,92 <sup>b</sup>	0,21 <sup>c</sup>	41,79 <sup>a</sup>	17,89 <sup>b</sup>	12,15 <sup>bc</sup>	0,05 <sup>c</sup>	5,15 <sup>c</sup>
		Bacteroidales		40,66 <sup>a</sup>	21,92 <sup>b</sup>	0,21 <sup>c</sup>	41,79 <sup>a</sup>	17,89 <sup>b</sup>	12,15 <sup>bc</sup>	0,05 <sup>c</sup>	5,15 <sup>c</sup>
			Bacteoidaceae	34,90 <sup>a</sup>	21,92 <sup>b</sup>	0,07 <sup>cd</sup>	37,76 <sup>a</sup>	8,87 <sup>c</sup>	4,07 <sup>cd</sup>	0,02 <sup>cd</sup>	0 <sup>d</sup>
Proteobacteria				2,90 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	20,96 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	10,89 <sup>ab</sup>	6,44 <sup>ab</sup>	6,21 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>b</sup>

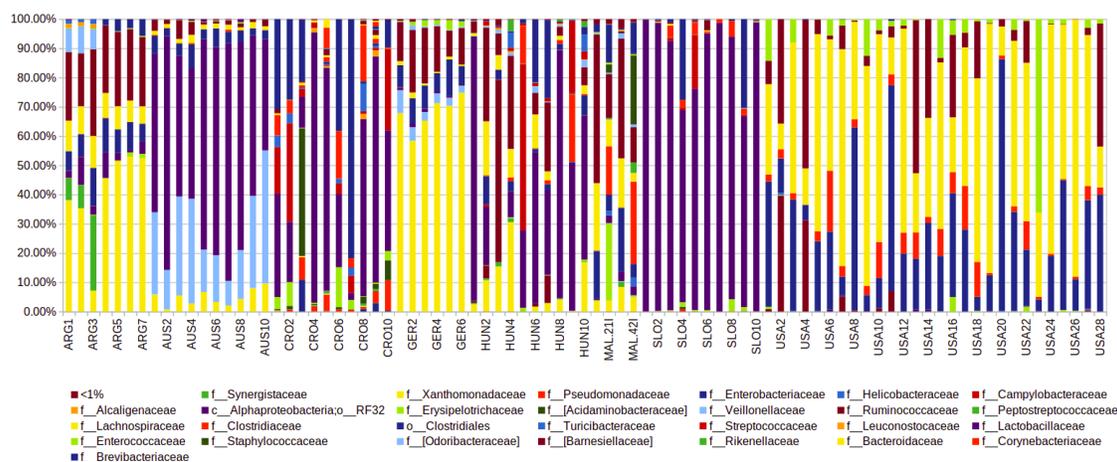
Epsilonbacteria	0,50	0	0,09	0	4,71 <sup>a</sup>	0	0,07	0
Campylobacterales	0,50	0	0,09	0	4,71 <sup>a</sup>	0	0,07	0
Gammaproteobacteria	1,82 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	20,87 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	6,07 <sup>ab</sup>	5,83 <sup>ab</sup>	6,14 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>b</sup>
Enterobacteriales	1,82 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	20,01 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	6,07 <sup>ab</sup>	5,83 <sup>ab</sup>	6,14 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>b</sup>
Enterobacteriaceae	1,82 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	20,01 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>	6,07 <sup>ab</sup>	5,83 <sup>ab</sup>	6,14 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>b</sup>

---

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos al realizar un ANOVA con comparaciones múltiples de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) utilizando el software STAMP.



**Apéndice 1.4. Análisis de agrupamiento (clustering) de las comunidades microbianas del TGI de pollos a nivel de género, basado en la disimilitud de Bray-Curtis, para las diferentes locaciones geográficas, resultado del análisis cerrado o “close reference”.**



**Apéndice 1.5. Abundancia relativa de las bacterias clasificadas a nivel familia de muestras de diferentes países resultado del análisis cerrado o “close reference”.** Las muestras de TGI de pollos evaluadas de las diferentes locaciones geográficas fueron designadas como AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malasia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos. La clasificación taxonómica está expresada como: c\_clase, o\_orden y f\_familia.

**Apéndice 1.6. Análisis estadístico de las abundancias relativas de las familias predominantes en el TGI de pollos, resultado del análisis cerrado o “close reference”.** Las diferentes locaciones geográficas evaluadas fueron designadas como AUS: Australia, ARG: Argentina, CRO: Croacia, GER: Alemania, HUN: Hungría, MAL: Malaysia, SLO: Eslovenia y USA: Estados Unidos.

Filo	Clase	Orden	Familia	ARG	AUS	CRO	GER	HUN	MAL	SLO	USA
Firmicutes				50,31 <sup>bc</sup>	70,29 <sup>b</sup>	72,48 <sup>b</sup>	27,81 <sup>c</sup>	72,07 <sup>b</sup>	85,56 <sup>a</sup>	93,62 <sup>a</sup>	96,89 <sup>a</sup>
	Clostridia			45,05 <sup>b</sup>	8,60 <sup>d</sup>	6,90 <sup>d</sup>	25,28 <sup>bc</sup>	24,86 <sup>c</sup>	74,72 <sup>a</sup>	2,79 <sup>d</sup>	90,86 <sup>a</sup>
		Clostridiales		45,05 <sup>b</sup>	8,60 <sup>d</sup>	6,90 <sup>d</sup>	25,28 <sup>bc</sup>	24,86 <sup>c</sup>	74,72 <sup>a</sup>	2,79 <sup>d</sup>	90,86 <sup>a</sup>
			Ruminococcaceae	23,97 <sup>a</sup>	2,35 <sup>b</sup>	0,72 <sup>b</sup>	15,11 <sup>ab</sup>	11,58 <sup>b</sup>	29,69 <sup>a</sup>	0,51 <sup>b</sup>	11,62 <sup>ab</sup>
			Lachnospiraceae	8,63	1,61	0,45	1,01	5,31	12,97	0,15	46,83 <sup>a</sup>
			Veillonellaceae	3,46 <sup>a</sup>	0,00	0,00	0,61	0,86	0,87	0,02	0,00
	Bacilli			5,08 <sup>c</sup>	61,54 <sup>b</sup>	65,57 <sup>b</sup>	0,8 <sup>c</sup>	47,21 <sup>b</sup>	10,5 <sup>c</sup>	90,83 <sup>a</sup>	0,52 <sup>c</sup>
		Lactobacillales		5,07 <sup>c</sup>	61,54 <sup>b</sup>	57,55 <sup>b</sup>	0,8 <sup>c</sup>	47,17 <sup>b</sup>	9,14 <sup>c</sup>	90,73 <sup>a</sup>	0,45 <sup>c</sup>
			Lactobacillaceae	4,53 <sup>c</sup>	61,54 <sup>b</sup>	44,19 <sup>b</sup>	0,75 <sup>c</sup>	41,09 <sup>b</sup>	2,36 <sup>c</sup>	87,85 <sup>a</sup>	0,13 <sup>c</sup>
		Turicibacterales		0,00	0,00	2,22 <sup>a</sup>	0,00	0,04	1,16	0,01	0,07
			Turicibacteraceae	0,00	0,00	2,22 <sup>a</sup>	0,00	0,04	1,16	0,01	0,07
Bacteroidetes				46,30 <sup>b</sup>	29,33 <sup>bc</sup>	0,37 <sup>e</sup>	72,00 <sup>a</sup>	16,78 <sup>cd</sup>	6,42 <sup>de</sup>	0,09 <sup>e</sup>	3,06 <sup>e</sup>
	Bacteroidia			46,30 <sup>b</sup>	29,33 <sup>bc</sup>	0,37 <sup>e</sup>	72,00 <sup>a</sup>	16,78 <sup>cd</sup>	6,42 <sup>de</sup>	0,09 <sup>e</sup>	3,06 <sup>e</sup>
		Bacteroidales		46,30 <sup>b</sup>	29,33 <sup>bc</sup>	0,37 <sup>e</sup>	72,00 <sup>a</sup>	16,78 <sup>cd</sup>	6,42 <sup>de</sup>	0,09 <sup>e</sup>	3,06 <sup>e</sup>
			Bacteoidaceae	40,42 <sup>b</sup>	4,88 <sup>cd</sup>	0,13 <sup>d</sup>	67,97 <sup>a</sup>	8,49 <sup>c</sup>	5,19 <sup>cd</sup>	0,05 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>

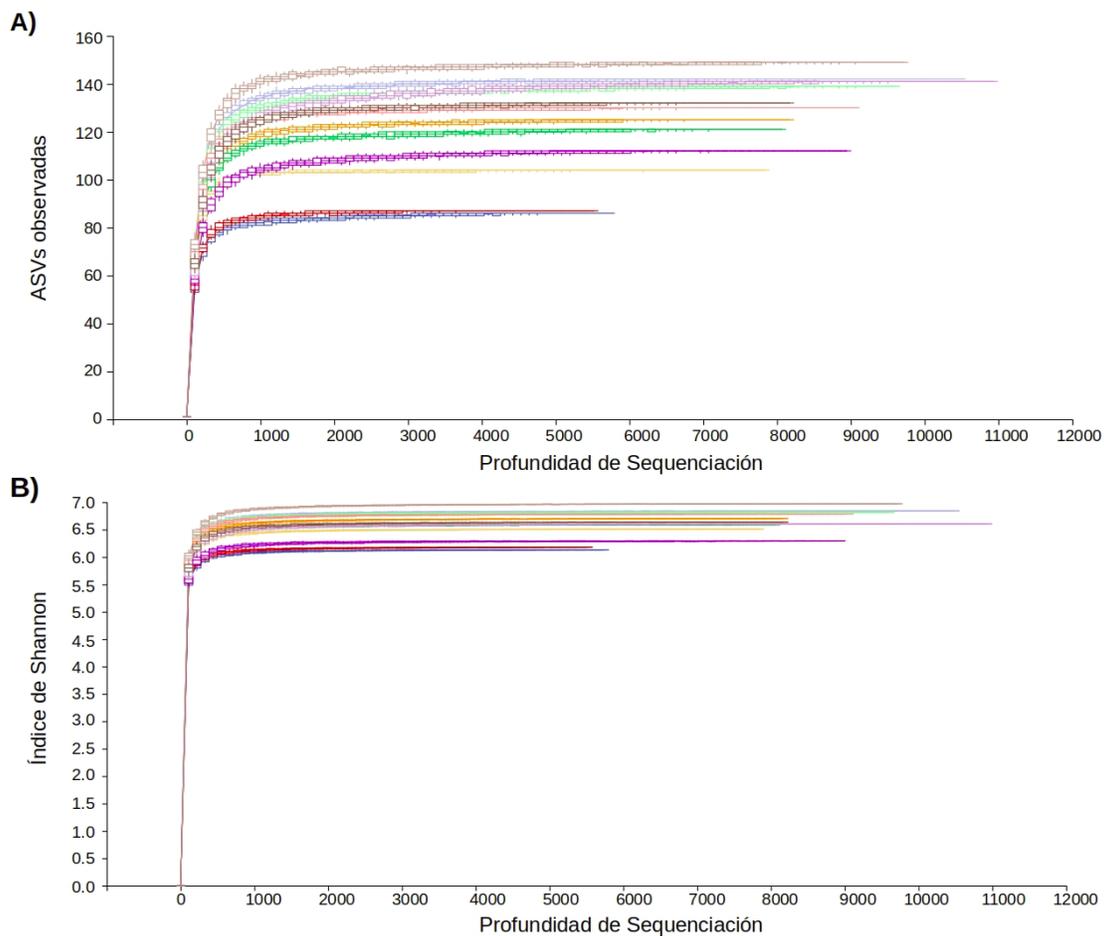
		[Odoribacteraceae]	0,00	24,39 <sup>a</sup>	0,00	4,03	0,01	0,05	0,00	0,00
		Rikenellaceae	5,88 <sup>a</sup>	0,00	0,24	0,00	0,48	0,55	0,03	0,00
Proteobacteria			3,35 <sup>b</sup>	0,38 <sup>b</sup>	22,31 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	10,45 <sup>ab</sup>	7,48 <sup>ab</sup>	6,17 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>
	Epsilonbacteria		0,55	0,00	0,07	0,00	4,52 <sup>a</sup>	0,00	0,08	0,00
		Campylobacterales	0,55	0,00	0,07	0,00	4,52 <sup>a</sup>	0,00	0,08	0,00
		Campylobacteraceae	0,00	0,00	0,00	0,00	3,37 <sup>a</sup>	0,00	0,07	0,00
	Gammaproteobacteria		2,17	0,00	22,20 <sup>a</sup>	0,19	5,39	6,82	6,08	0,05
		Enterobacteriales	2,17	0,00	20,98 <sup>a</sup>	0,19	5,39	6,66	6,08	0,05
		Enterobacteriaceae	2,17	0,00	20,98 <sup>a</sup>	0,19	5,39	6,65	6,08	0,05
Actinobacteria			0,05	0,00	4,84 <sup>a</sup>	0,00	0,02	0,32	0,13	0,00
	Actinobacteria		0,05	0,00	4,84 <sup>a</sup>	0,00	0,02	0,12	0,13	0,00
		Actinomycetales	0,05	0,00	4,84 <sup>a</sup>	0,00	0,02	0,11	0,13	0,00
		Corynebacteriaceae	0,01	0,00	3,26 <sup>a</sup>	0,00	0,02	0,03	0,12	0,00

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de acuerdo al test ANOVA con corrección de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) realizado en el software STAMP.

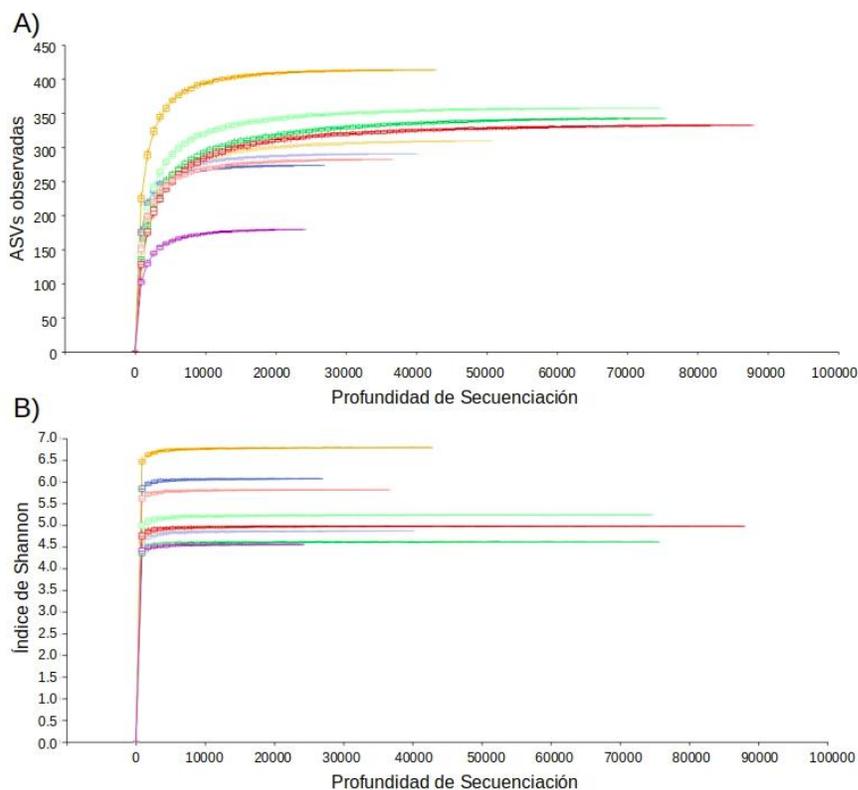
**Apéndice 1.7. Análisis estadísticos de las familias predominantes en la microbiota del TGI de pollos de Argentina.** Se utilizaron muestras provenientes de CP: Avicultura convencional, ET: ensayos experimentales, y AE: granja agroecológica.

Filo	Clase	Orden	Familia	CP	ET	AE	
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales		45,79 <sup>b</sup>	50,67 <sup>b</sup>	27,11 <sup>a</sup>	
				41,18 <sup>b</sup>	47,23 <sup>b</sup>	25,68 <sup>a</sup>	
				41,18 <sup>b</sup>	47,23 <sup>b</sup>	25,68 <sup>a</sup>	
				Ruminococcaceae	18,22 <sup>b</sup>	17,64 <sup>b</sup>	4,96 <sup>a</sup>
				Lachnospiraceae	5,43	7,82	4,36
				Veillonelaceae	4,98	2,49	7,35
		Bacilli	Lactobacillales		3,81 <sup>b</sup>	3,24 <sup>b</sup>	0,57 <sup>a</sup>
				3,78 <sup>b</sup>	3,23 <sup>b</sup>	0,34 <sup>a</sup>	
				3,68 <sup>b</sup>	2,87 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>	
	Bacteroidetes	Bacteroidea	Bacteroidales		46,75	44,84	38,35
				46,75	44,84	38,35	
				46,75	44,84	38,35	
				18,56 <sup>b</sup>	33,47 <sup>a</sup>	18,28 <sup>b</sup>	
				15,47 <sup>a</sup>	5,86 <sup>b</sup>	1,46 <sup>b</sup>	
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales		8,39	5,5	1,27	
				2,52 <sup>b</sup>	3,41 <sup>b</sup>	8,01 <sup>a</sup>	
				0,41 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	2,32 <sup>b</sup>	
				Desulfovibrionaceae	0,41 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	2,32 <sup>b</sup>
		Alphaproteobacteria	RF32		0,09 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,30 <sup>b</sup>
				0,09 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,29 <sup>b</sup>	
		Gammaproteobacteria	Enterobacteriales		0,32 <sup>a</sup>	2,08 <sup>b</sup>	1,68 <sup>b</sup>
				0,32 <sup>b</sup>	1,96 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	
				0,32 <sup>b</sup>	1,96 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	

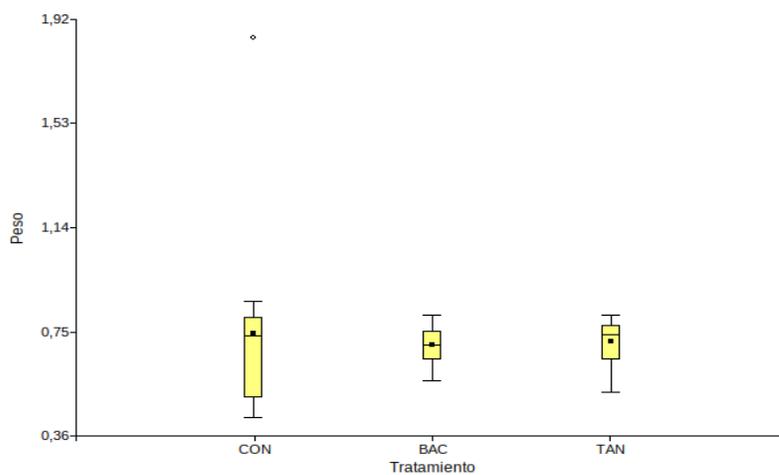
Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre muestras de acuerdo a un test ANOVA con corrección de Bonferroni para test múltiples ( $p < 0,05$ ) realizados en STAMP.



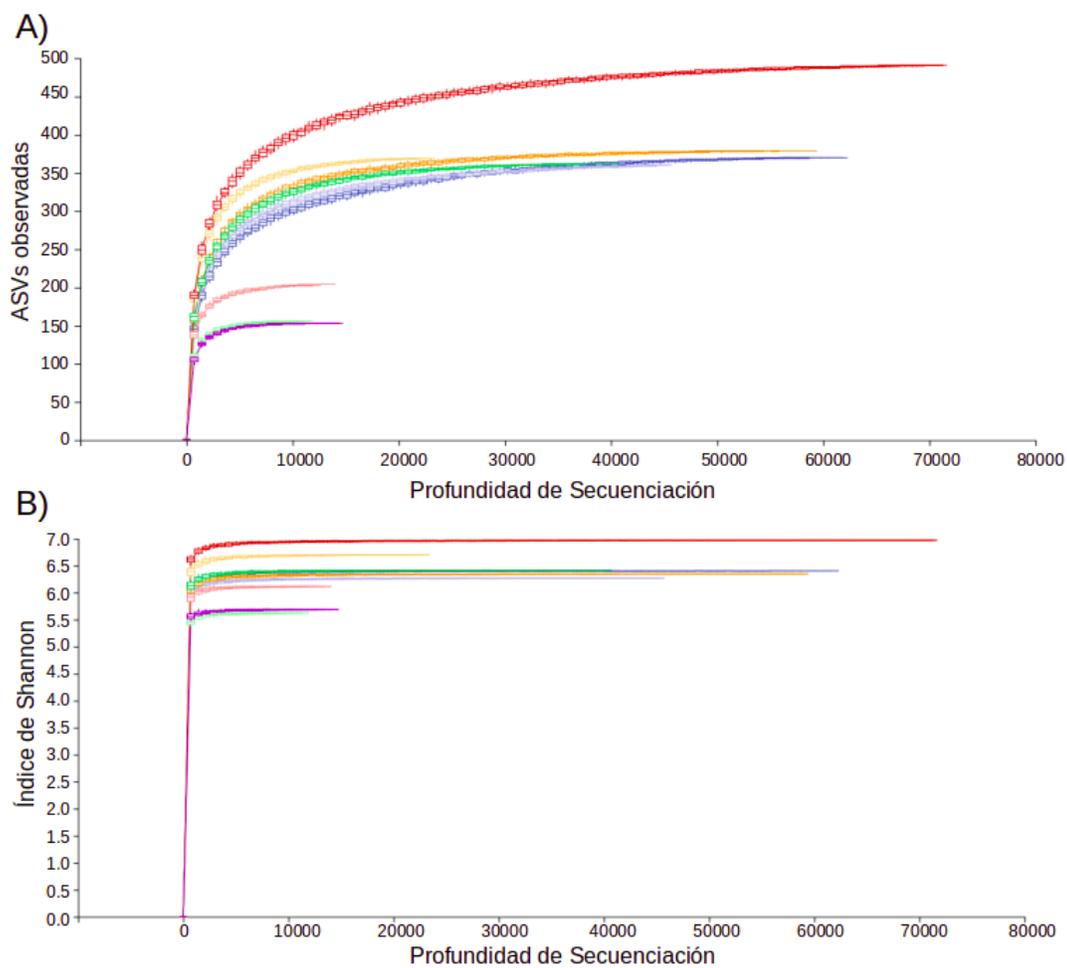
**Apéndice 2.1. Curvas de rarefacción correspondientes a las ASVs observadas y al índice de Shannon, obtenidos en base a las secuencias de la región V3-V4 del gen ARNr 16S, de las muestras del ensayo 1. Cada curva representa una muestra.**



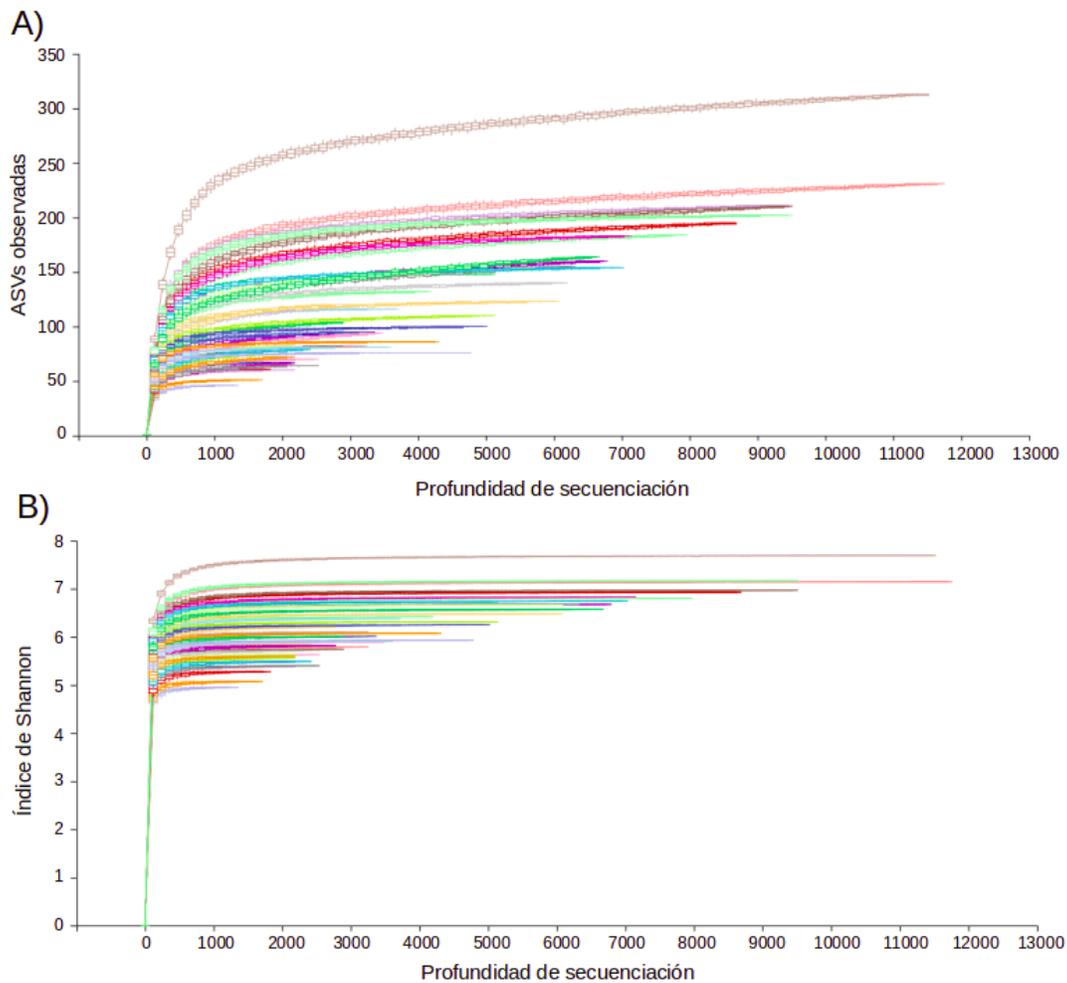
**Apéndice 2.2. Curvas de rarefacción correspondientes a los ASVs observadas y al índice de Shannon, obtenidos en base a las secuencias de la región V3-V4 del gen ribosomal 16S, de muestras de ciegos del ensayo 2. Cada curva representa una muestra.**



**Apéndice 2.3. Gráfico de cajas (Box-plots) para los pesos del total de los animales utilizados por tratamiento en el ensayo 2.**



**Apéndice 2.4. Curvas de rarefacción correspondientes a los ASVs observadas y al índice de Shannon, obtenidos en base a las secuencias de la región V3-V4 del gen ribosomal 16S, de muestras de cama del ensayo 2. Cada curva representa una muestra.**



**Figura 2.5.** Curvas de rarefacción correspondientes a los ASVs observadas y al índice de Shannon, obtenidos en base a las secuencias de la región V3-V4 del gen ribosomal 16S, de muestras de cama de granjas comerciales. Cada curva representa una muestra.

**Apéndice 3.1. Correlación de Spearman de la diversidad bacteriana en los residuos avícolas (ASVs observadas, Faith PD, índice de Shannon e índice de uniformidad de Pielou) y parámetros fisicoquímicos y fitotóxicos.**

Parameter	ASVs observadas	Faith PD	Shannon	Equitatividad
IRE (mg O <sub>2</sub> g OM <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$\rho=0,1429; p=0,7872$	$\rho=0,1429; p=0,7872$	$\rho=0,3143; p=0,5441$	$\rho=0,6571; p=0,1562$
MS (%)	$\rho=-0,2571; p=0,6228$	$\rho=-0,2571; p=0,6228$	$\rho=-0,4857; p=0,3287$	$\rho=-0,4857; p=0,3287$
MO (%)	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,4286; p=0,3965$	$\rho=-0,0857; p=0,8717$
NT (%)	$\rho=-0,2571; p=0,6228$	$\rho=-0,2571; p=0,6228$	$\rho=0,0286; p=0,9572$	$\rho=0,2571; p=0,6228$
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	$\rho=0,2571; p=0,6228$	$\rho=0,2571; p=0,6228$	$\rho=0,5429; p=0,2657$	$\rho=0,5429; p=0,2657$
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	<b><math>\rho=-1,000; p=0,0001</math></b>	<b><math>\rho=-1,000; p=0,0001</math></b>	$\rho=-0,5000; p=0,6667$	$\rho=-0,5000; p=0,6667$
pH	$\rho=0,0870; p=0,8699$	$\rho=0,0870; p=0,8699$	$\rho=-0,3479; p=0,4993$	$\rho=-0,6377; p=0,1731$
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	$\rho=0,3143; p=0,5441$	$\rho=0,3143; p=0,5441$	$\rho=0,7714; p=0,0724$	$\rho=0,7714; p=0,0724$
PT (mg Kg <sup>-1</sup> )	$\rho=0,2000; p=0,7040$	$\rho=0,2000; p=0,7040$	$\rho=0,4286; p=0,3965$	$\rho=0,3143; p=0,5441$
GI-lechuga	$\rho=0,2000; p=0,7040$	$\rho=0,2000; p=0,7040$	$\rho=-0,1429; p=0,7872$	$\rho=-0,4857; p=0,3287$
RGI-lechuga	$\rho=0,2319; p=0,6584$	$\rho=0,2319; p=0,6584$	$\rho=-0,0870; p=0,8699$	$\rho=-0,3769; p=0,4615$
GI-radicheta	$\rho=0,5429; p=0,2657$	$\rho=0,5429; p=0,2657$	$\rho=0,4286; p=0,3965$	$\rho=0,3143; p=0,5441$
RGI-radicheta	$\rho=0,6000; p=0,2080$	$\rho=0,6000; p=0,2080$	$\rho=0,3714; p=0,4685$	$\rho=0,1429; p=0,7872$
GI-zapallito	$\rho=-0,771; p=0,0724$	$\rho=-0,7714; p=0,0724$	<b><math>\rho=-0,8857; p=0,0188</math></b>	$\rho=-0,3143; p=0,5441$
RGI-zapallito	$\rho=-0,7714; p=0,0724$	$\rho=-0,7714; p=0,0724$	<b><math>\rho=-0,8286; p=0,0416</math></b>	$\rho=-0,1429; p=0,7872$
GI-rúcula	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,7714; p=0,0724$	$\rho=-0,7714; p=0,0724$
RGI-rúcula	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,7714; p=0,0724$	$\rho=-0,7714; p=0,0724$
GI-achicoria	$\rho=-0,2571; p=0,6228$	$\rho=-0,2571; p=0,6228$	$\rho=-0,4857; p=0,3287$	$\rho=-0,4857; p=0,3287$
RGI-achicoria	$\rho=0,0286; p=0,9572$	$\rho=0,0286; p=0,9572$	$\rho=-0,3143; p=0,5441$	$\rho=-0,5429; p=0,2657$

IRE= índice respirométrico estático; MS= Materia seca; MO = Materia orgánica; NT = Nitrógeno Total Kjeldahl en base seca; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = N-amoniaco en base seca; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = N-nitrato en base seca; CE = Conductividad Eléctrica; PT = Fósforo Total en base seca; GI= índice de germinación; RGI= índice de crecimiento relativo.

**Apéndice 3.2. Correlación de Spearman de la diversidad bacteriana presente en muestras de suelos (ASVs observadas, Faith PD, índices de diversidad de Shannon y equitatividad de Pielou) y parámetros fisicoquímicos y fitotóxicos**

Parámetro	ASVs Observadas	Faith PD	Shannon	Equitatividad
MS (%)	$\rho=0,6167; p=0,0769$	$\rho=0,4500; p=0,2242$	$\rho=0,6167; p=0,0769$	$\rho=0,0833; p=0,8312$
MO (%)	$\rho=-0,333; p=0,9322$	$\rho=-0,0833; p=0,8312$	$\rho=0,0333; p=0,9322$	$\rho=-0,1677; p=0,6682$
NT (%)	$\rho=0,3614; p=0,3393$	$\rho=0,2101; p=0,5874$	$\rho=0,5630; p=0,1145$	$\rho=0,4958; p=0,1747$
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	$\rho=0,4108; p=0,2721$	$\rho=0,4108; p=0,2721$	$\rho=0,4108; p=0,2721$	$\rho=-0,2739; p=0,4758$
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	$\rho=0,0000; p=1,0000$	$\rho=-0,1369; p=0,7254$	$\rho=-0,2739; p=0,4758$	$\rho=-0,4108; p=0,2721$
pH	$\rho=-0,1333; p=0,7324$	$\rho=0,0500; p=0,8984$	$\rho=-0,0833; p=0,8312$	$\rho=-0,2667; p=0,4879$
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,4667; p=0,2054$	$\rho=-0,3333; p=0,3807$	$\rho=-0,4167; p=0,2646$	$\rho=-0,0500; p=0,8984$
PT (mg Kg <sup>-1</sup> )	<b><math>\rho=-0,6833; p=0,0424</math></b>	$\rho=-0,5167; p=0,1544$	$\rho=-0,6333; p=0,0671$	$\rho=-0,0500; p=0,8984$
Pe (mg Ng <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,3000; p=0,4328$	$\rho=-0,0667; p=0,8647$	$\rho=-0,1667; p=0,6682$	$\rho=0,1667; p=0,6682$

MS= Materia Seca; MO = Materia Orgánica; NT = Nitrógeno Total Kjeldahl en base seca; CE = Conductividad Eléctrica; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = N-amoniacal en base seca; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = N-nitrato en base seca; PT = Fósforo Total en base seca; Pe = Fósforo Extractable.

**Apéndice 3.3. Correlación de Spearman entre parámetros de alfa diversidad (ASV observadas, índices de Faith PD, de Shannon y equitatividad de Pielou) y parámetros fisicoquímicos de enmiendas crudas y tratadas. Sólo se muestran correlaciones significativas.**

Parámetro	ASVs Observadas	Faith PD	Shannon	Equitatividad
MS (%)	Ns	Ns	Ns	$\rho=0,8000; p=0,0096$
pH	$\rho=0,6836; p=0,0423$	Ns	Ns	$\rho=-0,7849; p=0,0122$
CE (mS cm <sup>-1</sup> )	$\rho=0,7000; p=0,0358$	$\rho=0,6833; p=0,0424$	Ns	$\rho=-0,6833; p=0,0424$
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,6950; p=0,0377$	$\rho=-0,6781; p=0,0447$	Ns	$\rho=0,7120; p=0,0314$
Co (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,8257; p=0,0061$	$\rho=-0,7321; p=0,0249$	$\rho=-0,6555; p=0,0553$	$\rho=0,8087; p=0,0083$
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,6781; p=0,0447$	$\rho=-0,6781; p=0,0447$	Ns	$\rho=0,8645; p=0,0026$
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,7833; p=0,0125$	$\rho=-0,6833; p=0,0424$	$\rho=-0,6833; p=0,0424$	ns
As (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,8000; p=0,0096$	$\rho=-0,7500; p=0,0199$	Ns	$\rho=0,7833; p=0,0125$
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,7967; p=0,0102$	Ns	Ns	$\rho=0,6781; p=0,0447$
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	$\rho=-0,7289; p=0,0259$	$\rho=-0,7628; p=0,0168$	Ns	$\rho=0,6781; p=0,0447$
PT (mg kg <sup>-1</sup> MS)	$\rho=0,9000; p=0,0009$	$\rho=0,8833; p=0,0016$	$\rho=0,7667; p=0,0159$	$\rho=-0,7500; p=0,0199$

MS= materia seca; CE= conductividad eléctrica; PT= fósforo total. ns= no significativo

## Índice de Tablas

### Capítulo 1: La geografía como factor de modulación no genético de la microbiota cecal de pollos

1.1 Conjunto de datos de secuenciación masiva de amplicones del gen ARN ribosomal 16S utilizados para comparar la composición de la microbiota del TGI de pollos en función de la locación geográfica.....	20
1.2 Muestras de microbiota cecal de Argentina de granjas comerciales.....	21
1.3 Ajuste de los diferentes factores de la metadata en el agrupamiento basado en distancias UniFrac no ponderadas.....	26
1.4 Índices de alfa diversidad para muestras de pollo correspondientes a las diferentes locaciones geográficas, resultado del análisis abierto u “open reference”.....	28
1.5 Ajuste de los diferentes factores de la metadata en el agrupamiento basado en distancias UniFrac no ponderadas.....	30
1.6 Índices de alfa diversidad para muestras de pollo de las diferentes locaciones geográficas, resultado del análisis cerrado o “close reference”.....	32
1.7 Índices de alfa diversidad para las muestras de ciegos argentinos.....	35
1.8 Lista de OTUs compartidas entre las muestras de ciegos de Argentina.....	38

### Capítulo 2: Los promotores de crecimiento como factores de modulación del ambiente productivo.

2.1 Datos de muestreo de camas de pollo de galpones comerciales.....	58
2.2 Índice de diversidad alfa para las muestras correspondientes a los tres tratamientos y los cuatro tiempos de muestreo evaluados en el ensayo 1.....	65
2.3 Parámetros de crecimiento de animales en los diferentes grupos del ensayo 1.....	67
2.4 Valores de diversidad alfa evaluada en ciegos para los distintos tratamientos dietarios del ensayo 2.....	76
2.5 Parámetros de crecimiento de animales en los diferentes grupos del ensayo 2.....	77

2.6 Valores de diversidad alfa evaluada para las camas de los distintos tratamientos dietarios utilizados en el ensayo 2.....	81
2.7 Diferencias encontradas entre las camas de granja comerciales al realizar el análisis de ANCOM.....	87
2.8 Valores de diversidad alfa evaluada para las camas comerciales sometidas a los distintos tratamientos dietarios.....	88

### **Capítulo 3: Utilización de residuos avícolas**

3.1 Propiedades fisicoquímicas de los residuos avícolas.....	131
3.2 Puntos finales de toxicidad e índices de fitotoxicidad medios ( $\pm$ DE) para cada especie de planta expuesta a extractos acuosos de guano y cama de pollos.....	133
3.3 Taxa con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes residuos avícolas.....	135
3.4 Propiedades fisicoquímicas de los suelos.....	139
3.5 Propiedades fisicoquímicas de las enmiendas crudas (guano) y tratadas (compost y digerido).....	144
3.6 Abundancia relativa de los diferentes taxa que mostraron significancia estadística en el análisis ANCOM realizado a diferentes niveles entre enmiendas crudas y tratadas.....	147
3.7 Principales familias encontradas en las comunidades de bacterias presente en los residuos avícolas.....	153
3.8 Principales familias encontradas en las comunidades de bacterias presentes en los suelos.....	159

## Índice de figuras

### Capítulo 1: La geografía como factor de modulación no genético de la microbiota cecal de pollos

1.1 Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac no ponderadas resultado del análisis abierto u “open reference” .....	26
1.2 Mapa geográfico de la microbiota del TGI de pollos a nivel familia resultado del análisis abierto u “open reference” .....	27
1.3 Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac no ponderadas resultado del análisis cerrado o “close reference” .....	29
1.4 Mapa geográfico de la microbiota del TGI de pollos a nivel familia resultado del análisis cerrado o “close reference” .....	31
1.5 Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac no ponderadas de las muestras argentinas.....	34
1.6 Abundancia relativa de las bacterias clasificadas a nivel familia de muestras argentinas.....	36
1.7 Gráfico de UpSet y diagrama de Venn para las muestras de Argentina.....	37

### Capítulo 2: Los promotores de crecimiento como factores de modulación del ambiente productivo.

2.1 Ensayo en granja comercial.....	55
2.2 Gráficos de composición de las comunidades microbianas a nivel filo de ciegos del ensayo 1.....	61
2.3 Relación Firmicutes/Bacteroidetes a lo largo del tiempo para los tres tratamientos evaluados en ciegos de animales del ensayo 1.....	62
2.4 Gráficos de composición de las comunidades microbianas a nivel familia de ciegos de animales del ensayo 1.....	63
2.5 Gráfico de composición de las comunidades microbianas a nivel género de ciegos de animales del ensayo 1.....	64
2.6 Índice de alfa diversidad (ASVs observadas e índice de Shannon), obtenidos de ciegos de animales del ensayo 1.....	65

2.7 PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de las muestras de ciego provenientes del ensayo 1.....	67
2.8 PCoA de las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) entre muestras de ciego y cama provenientes del ensayo 2.....	68
2.9 Composición de las comunidades de bacterias a nivel filo (a) y familia (b) de las muestras provenientes del ensayo 2.....	69
2.10 Diferencias a nivel de filo encontradas entre los dos tipos de muestras evaluadas en el ensayo 2 (cama y ciego).....	70
2.11 ASVs presentes y compartidas entre muestras analizadas de cama y ciegos provenientes del ensayo 2.....	71
2.12 Gráfico de composición de las comunidades microbianas de ciegos a nivel filo del ensayo 2.....	72
2.13 Gráficos de composición de las comunidades microbianas de ciegos a nivel a) familia y b) género del ensayo 2.....	75
2.14 PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de ciegos provenientes del ensayo 2.....	77
2.15 Gráfico de composición de las comunidades microbianas de camas del ensayo 2 a nivel filo.....	79
2.16 Gráficos de composición de las comunidades microbianas de camas del ensayo 2 evaluadas a nivel a) familia y b) género.....	82
2.17 PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de las muestras de cama del ensayo 2.....	83
2.18 Gráfico de composición de las comunidades microbianas de cama de granjas comerciales a nivel filo.....	85
2.19 Gráfico de composición microbiana de camas de granjas comerciales evaluadas a nivel familia.....	86
2.20 Abundancias relativas del género <i>Moheibacter</i> para las muestras de cama de pollo provenientes de granjas comerciales.....	87
2.21 Gráficos de caja (Boxplots) para los índices de alfa diversidad evaluada en muestras de camas de granja comerciales por tratamiento.....	89

2.22 PCoA basado en las distancias UniFrac ponderadas (a) y no ponderadas (b) de las muestras de cama de granja comerciales.....	90
2.23 ASVs compartidas entre las muestras de camas de pollo provenientes de los ensayos 2 y 3 .....	91

### **Capítulo 3: Utilización de residuos avícolas**

3.1 Diagrama de volcán y gráficos de caja a nivel de filo (A) y género (B) de residuos avícolas.....	134
3.2 Gráfico de barras de la estructura de las comunidades de residuos avícolas a nivel filo (A) y familia (B).....	136
3.3 Diagramas de caja de las ASVs observadas (A) e índice de Shannon (B) para los residuos avícolas evaluados.....	137
3.4 Gráficos 3D del PCoA a partir de métricas UniFrac ponderadas (A) y no ponderadas (B) para residuos avícolas.....	138
3.5 Gráficos de barras de la estructura de comunidades microbianas presentes en suelos a nivel de filo (A) y familia (B).....	140
3.6 Gráfico de caja de las ASVs observadas (A) e índice de Shannon (B) para las muestras de suelo.....	141
3.7 Correlación de Spearman entre las ASVs observadas y el PT de muestras de suelo.....	142
3.8 Gráficos 3D del PCoA a partir de métricas UniFrac ponderadas (A) y no ponderadas (B) para muestras de suelo.....	143
3.9 Comparación de las comunidades microbianas provenientes de muestras de guano de pollo crudas o tratadas (compostaje o digestión anaeróbica).....	146