



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Análisis de la influencia de la calidad de agua sobre la microbiota intestinal presente en las heces de pollos de engorde de la empresa Grupo Casa Grande.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autoras: Carla Melanie Aguilar Castillo

Angela Nicole Manzaba Yépez

Tutora: MSc. María Daniela Garcés Moncayo

Ambato – Ecuador

Febrero – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

CERTIFICA

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 15 de enero del 2024

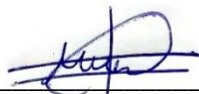
MSc. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 1803571585

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Carla Melanie Aguilar Castillo y Angela Nicole Manzaba Yépez, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Carla Melanie Aguilar Castillo

C.I. 1805541560

AUTORA



Angela Nicole Manzaba Yépez

C.I. 1804410841

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga del presente Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedemos los derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Carla Melanie Aguilar Castillo

C.I. 1805541560

AUTOR



Angela Nicole Manzaba Yépez

C.I. 1804410841

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente de Tribunal

PhD. William Ricardo Calero Cáceres
17143448859

Dra. Helena Maritza de la Torre Olvera
1309651998

Ambato, 06 de febrero del 2024

DEDICATORIA

“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos días tras días”

Este proyecto de titulación va dedicado a todo mi esfuerzo y perseverancia.

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida .

A mis padres Carlos y Sandra por impulsarme a ser mejor cada día y formar un pilar muy importante en mi vida.

A mis hermanos Bryan y Esteban por su cariño.

A mis abuelitos Teresa, Medardo y Tereza por velar por mi bienestar.

A mis tíos Fernando, Javier, Iván, Adelita y en especial Carmita por motivarme a cumplir mis sueños.

A mi prima Alejandra por ser mi compañera incondicional.

A mi compañero y mi gran amor Juanito por sus consejos.

A mis amigos que siempre me sacaron una sonrisa.

A todas las personas que creyeron en mí.


Melanie Aguilar

DEDICATORIA

A los promotores de mi vida y ejemplo a seguir mis padres Odalia y Segundo quienes a pesar de la dificultades siempre me han ayudado y apoyado a lo largo de mi vida.

A mi hermana Amanda por siempre estar conmigo.

A mi abuelita por motivarme a seguir adelante.

A mi abuelito  a quien siempre llevaré en mi corazón.

A la Licenciada Diana Morejón por creer en mí.

A mis amigos que han sido parte fundamental durante todo este proceso y por ser un rayo de luz en mi vida.

A todas las personas que han formado parte de mi vida y han confiado en mí.

Angy Manzaba

AGRADECIMIENTO

Se culmina una etapa maravillosa en mi vida que me ha dejado recuerdos memorables, amistades maravillosas y una enseñanza increíble. En primer lugar, agradezco a mis padres Carlos Aguilar y Sandra Castillo quienes han sido mi mayor apoyo en este proceso. Gracias por creer en mis capacidades y por motivarme a superar cualquier obstáculo siempre con perseverancia y haciendo las cosas bien.

A mis hermanos Bryan y Esteban, quienes han sabido alegrarme, darme ánimos en las dificultades e impulsarme a cumplir todas mis metas.

A mis abuelitos maternos Teresa y Medardo y a mi abuelita paterna Tereza, por velar diariamente por mi bienestar durante todo este trayecto, brindando su cariño y enseñanzas. A todos mis tíos Fernando, Javier, Iván, Adelita y en especial a Carmita por aconsejarme, brindarme todo su apoyo y abrirme las puertas de su casa siempre que lo necesite.

A mi prima Alejandra a quien considero como una hermana, que a lo largo de todo este camino me brindo su cariño, desvelándose conmigo si era necesario para lograr cumplir mis tareas, secando mis lágrimas y dándome palabras de aliento.

A Juanito una persona maravillosa que conocí a la mitad de mi etapa universitaria. Su amor y cariño han sido incondicionales durante estos años, siempre cuidó de mí y estuvo pendiente de mi bienestar y salud pese a las dificultades.

A mi compañera de tesis y mi amiga Angy, por aceptar trabajar conmigo en este proyecto, siempre con la mejor disposición de sacar adelante todo lo que nos hemos propuesto. Me brindó su compañía, su tiempo y es una de las que más ha creído en mí.

También deseo agradecer a mis amigos Carito, Vanessa, Erika, Jennifer, Lizbeth, Yadira y Fernando que junto a mi compartieron risas, llantos y salidas. Los recuerdos que tengo junto a ustedes siempre los llevaré en mi corazón. Gracias por su amistad.

Finalmente deseo agradecer a la empresa Grupo Casa Grande por permitirme realizar la investigación de este proyecto. A mi tutora MSc. María Daniela Garces por haber compartido sus conocimientos y guiarme en cada etapa de este proyecto.

Melanie Aguilar

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a mis padres Odalia Yépez y Segundo Manzaba quienes son mi motivo para luchar y cumplir con todo lo que me propongo, gracias por ser mi guía, apoyo e inspiración para cumplir mis objetivos personales y académicos. Gracias por motivarme a seguir adelante y enseñarme a jamás rendirme. Además, agradezco a mi hermana que a pesar de todo siempre ha estado conmigo apoyándome para seguir adelante. Además, quiero agradecer a mi abuelita que a pesar de la distancia siempre me ha brindado su amor y motivación.

Agradezco a mis amigos Jeny, Santy y José con quienes inicié mi carrera universitaria y hoy en día considero parte importante de mi vida. Gracias por estar a mi lado, por apoyarme, por muchas veces levantarme el ánimo, por sacarme de mi zona de confort y por brindarme una palabra de aliento cada vez que lo necesito. Gracias por cada uno de los momentos que hemos vividos.

A todos mis profesores que han estado presentes a lo largo de toda mi vida académica en especial a la Licenciada Diana Morejón a quien considero un ejemplo a seguir. Gracias por creer y confiar en mí, gracias por su cariño sincero y por cada una de las palabras de aliento brindadas.

Especialmente agradezco a mi compañera y amiga Melanie con quien llevé a cabo la ejecución de este proyecto. Gracias por tu paciencia, tiempo y dedicación. Gracias por impulsarme para continuar, sin tu apoyo no lo hubiese logrado.

Agradezco a la empresa Grupo Casa Grande por permitirme participar en esta investigación. Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a mi tutora MSc. María Daniela Garcés Moncayo por haberme guiado en la elaboración de este trabajo de titulación, quien con su dirección, enseñanzas y conocimientos hizo esto posible.

Angy Manzaba

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	viii
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	xiii
INDICE GENRAL DE TABLAS	xiv
RESUMEN EJECUTIVO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Justificación.....	1
1.1.2 Importancia de la avicultura en el Ecuador	2
1.1.3 Características de los pollos de engorde de la línea genética Cobb 500 broiler	3
1.1.4 Microbiota de los pollos de engorde	5
1.1.5 Factores que alteran el microbioma de los pollos	9
1.1.5.1 Alimentación.....	9
1.1.5.2 Calidad del agua.....	11
1.1.5.3 Administración de antibióticos y probióticos	12
1.1.5.4 Clima y ubicación geográfica	14
1.1.6 Análisis metagenómico	15
1.1.6.1 Diversidad de la microbiota Alfa y Beta.....	16
1.2 Objetivos.....	18
1.2.1 Objetivo General	18

1.2.2	Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....		19
2.1	Materiales.....	19
2.1.1	Equipos de laboratorio.....	19
2.1.2	Instrumentos de laboratorio.....	19
2.1.3	Reactivos de laboratorio	20
2.2	Métodos	21
2.2.1	Identificación de los puntos para la toma de muestras de agua en dos diferentes granjas siguiendo el protocolo de muestreo establecido en la norma NTE INEN 1108.....	21
2.2.1.1	Tipo de Muestreo	21
2.2.1.2	Recolección de la muestra	21
2.2.1.3	Conservantes, transporte y almacenamiento.....	21
2.2.2	Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la calidad del agua de consumo aviar en base al manual de manejo de pollos COBB 22	
2.2.2.1	Análisis de las propiedades fisicoquímicos	22
2.2.2.2	Análisis de las propiedades microbiológicas	27
2.2.3	Desarrollo del análisis metagenómico de la microbiota intestinal de pollos de engorde para la obtención de la composición taxonómica de las comunidades microbianas	28
2.2.3.1	Toma de muestras de heces de las aves	28
2.2.3.2	Extracción de ADN.....	28
2.2.3.3	Calidad y cantidad de ADN	29
2.2.3.4	Amplificación y secuenciación por PCR.....	30
2.2.3.5	Análisis Bioinformático.....	30
2.2.3.6	Análisis de diversidad Alfa y Beta.....	31
2.2.3.7	Análisis de Alfa rarefacción.....	31
2.2.3.8	Análisis taxonómico	32
2.2.3.9	Análisis de abundancia diferencial	32
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		33

3.1	Análisis y discusión de los resultados.....	33
3.1.1	Obtención de parámetros físico químicos	33
3.1.1.1	pH.....	34
3.1.1.2	Cobre (Cu)	34
3.1.1.3	Dureza total.....	35
3.1.1.4	Hierro (Fe)	36
3.1.1.5	Nitratos (NO ³⁻).....	36
3.1.1.6	Zinc (Zn).....	37
3.1.1.7	Cloro libre.....	37
3.1.1.8	Calcio (Ca).....	38
3.1.1.9	Magnesio (Mg)	38
3.1.1.10	Sulfatos (SO ₄ ²⁻).....	39
3.1.1.11	Plomo (Pb)	39
3.1.2	Obtención de parámetros microbiológicos.....	40
3.1.2.1	<i>E. coli</i>	40
3.1.2.2	Bacterias coliformes	40
3.1.3	Análisis Metagenómico.....	41
3.1.3.1	Diversidad Alfa.....	41
3.1.3.2	Diversidad Beta.....	43
3.1.3.3	Análisis taxonómico a nivel de genero.....	45
3.1.3.4	Análisis de Abundancia relativa	47
3.1.3.5	Abundancia diferencial.....	51
3.1.3.6	Alfa rarefacción	53
	CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
4.1	Conclusiones.....	55
4.2	Recomendaciones	56
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	ANEXOS.....	76

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1 <i>Pollo de engorde Cobb 500.</i>	4
Figura 2. <i>Partes del tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos.</i>	7
Figura 3. <i>Análisis metagenómico por amplicon del gen 16S rRNA.</i>	16
Figura 4. <i>Análisis de coordenadas principales (PCoA)</i>	43
Figura 5. <i>Dendrograma de agrupamiento jerárquico.</i>	44
Figura 6. <i>Análisis taxonómico a nivel de género.</i>	45
Figura 7 <i>Gráfico de proporción de Gneiss de abundancia diferencial entre las granjas San José y Las Orquídeas.</i>	51
Figura 8. <i>Análisis de alfa rarefacción entre las dos granjas.</i>	53

INDICE GENRAL DE TABLAS

Tabla 1. <i>Principales líneas genéticas de aves productoras de carne (engorde) empleadas en la industria avícola ecuatoriana.</i>	4
Tabla 2. <i>Distribución espacial de los taxones bacterianos más comunes y abundantes en el tracto gastrointestinal de pollos.</i>	7
Tabla 3. <i>Equipos de laboratorio.</i>	19
Tabla 4. <i>Instrumentos de laboratorio.</i>	19
Tabla 5. <i>Reactivos de laboratorio.</i>	20
Tabla 6. <i>Parámetros para considerar para la determinación de metales pesados por el método de absorción atómica.</i>	26
Tabla 7. <i>Resultados de los análisis fisicoquímicos del agua en las diferentes granjas.</i>	33
Tabla 8. <i>Análisis microbiológicos del agua en las diferentes granjas.</i>	40
Tabla 9. <i>Resultado de diversidad de especies.</i>	41
Tabla 10. <i>Análisis de abundancia frente a los parámetros fisicoquímicos del agua.</i>	47

RESUMEN EJECUTIVO

La microbiota intestinal incluye microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que habitan dentro de organismos multicelulares complejos. Entre las principales funciones se destaca: regulación de actividades metabólicas, absorción de nutrientes y prevención de la colonización por patógenos. Sin embargo, la microbiota puede verse alterada por diversos factores como el agua, el alimento, la ingesta de antibióticos y la ubicación geográfica.

En este estudio se conoció si la calidad del agua influye en la microbiota intestinal de los pollos de engorde Cobb 500 de dos granjas (San José y Las Orquídeas) pertenecientes a la empresa Grupo Casa Grande. Para ello se realizó un análisis metagenómico de amplicon del gen 16s rRNA, utilizando ADN extraído de 4 muestras de heces de los pollos de engorde. El procesamiento de datos se realizó en la plataforma Galaxy vinculada a QIIME2.

El análisis de la calidad de agua estuvo dentro de los límites establecidos por las normas INEN 1108 y el Manual de Manejo de pollos Cobb 500, con excepción de la dureza del agua (granja Las Orquídeas). El índice de Shannon y el PCoA revelaron que las muestras de ambas granjas presentan una diversidad microbiana alta de OTU's y una diferencia mínima en la composición de la comunidad microbiana. Los análisis de abundancia relativa, abundancia diferencial y alfa rarefacción mostraron que los taxones más abundantes y con mayor riqueza de la microbiota fecal fue *Lactobacillus sp* y *Romboutsia sp*. La calidad del agua de las granjas no influyó en la composición de la microbiota intestinal de los pollos.

Palabras claves: microbiota intestinal, diversidad alfa, diversidad beta, OTU's, abundancia relativa, calidad del agua, pollos de engorde.

ABSTRACT

The gut microbiota includes commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms that inhabit complex multicellular organisms. Among the main functions, the following stand out: regulation of metabolic activities, absorption of nutrients and prevention of colonization by pathogens. However, the microbiota can be altered by various factors such as water, food, antibiotic intake and geographical location.

In this study, it was known whether water quality influences the intestinal microbiota of Cobb 500 broiler chickens from two farms (San José and Las Orquídeas) belonging to the Grupo Casa Grande company. For this purpose, a metagenomic amplicon analysis of the 16s rRNA gene was carried out, using DNA extracted from 4 fecal samples of broiler chickens. Data processing was performed on the Galaxy platform linked to QIIME2.

The analysis of water quality was within the limits established by INEN 1108 standards and the Cobb 500 Chicken Management Manual, with the exception of water hardness (Las Orquídeas farm). The Shannon index and PCoA revealed that samples from both farms present a high microbial diversity of OTUs and a minimal difference in the composition of the microbial community. The analyzes of relative abundance, differential abundance and alpha rarefaction showed that the most abundant and richest taxa of the fecal microbiota were *Lactobacillus* sp and *Romboutsia* sp. The water quality of the farms did not influence the composition of the intestinal microbiota of the chickens.

Keywords: intestinal microbiota, alpha diversity, beta diversity, OTUs, relative abundance, water quality, broiler chickens.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Justificación

En la actualidad, la calidad del agua de consumo en la industria avícola es uno de los factores que influyen en la productividad y rendimiento de las aves debido a que se encuentra implicada en varios aspectos metabólicos (Cao et al., 2021). Esta cumple un papel fundamental en la regulación de la temperatura corporal del ave, la digestión de alimentos y la eliminación de los desechos (Ajata Durán, 2021). Un parámetro relevante para realizar análisis de calidad de agua es la parte microbiológica que según normas NTE INEN 1108 (2011), se debe verificar la presencia de *Escherichia coli* y coliformes totales. La presencia de estos microorganismos en concentraciones elevadas puede causar colibacilosis en las aves (Cobb Vantress, 2019).

Otro factor que afecta al metabolismo de las aves es la composición fisicoquímica del agua; la concentración elevada de minerales y metales puede modificar el sabor de la misma, generar efectos laxantes, disminución del consumo de agua diaria y puede llegar a generar una disbiosis a nivel de la microbiota, lo que trae como consecuencia una disminución de los microorganismos benéficos que habitan comúnmente en el intestino (Comisión Nacional de Sanidad Avícola, 2018). La prevalencia de agentes infecciosos en el agua de consumo aviar, requiere la ingesta de antibióticos, que a largo plazo puede ocasionar el crecimiento de especies resistentes en la microbiota y alterar el equilibrio metabólico (Roth et al., 2019). Como consecuencia de ello, la composición de la microbiota intestinal podría no recuperarse completamente (Varón López et al., 2023). El manejo inadecuado de la calidad del agua representa un potencial peligro para la salud de las aves, afectando su microbiota intestinal.

En los últimos años las granjas avícolas de la empresa Grupo Casa Grande ha registrado alteraciones en el metabolismo gastrointestinal de las aves, lo que ha provocado efectos laxantes. En la investigación metagenómica realizada por Kang et al. (2021), se ha encontrado una gran cantidad de microorganismos en la microbiota intestinal de los pollos de engorde, entre los cuales destacan los géneros: *Clostridium*,

Flavonifractor y *Campylobacte*, mismos que presentan características potencialmente patógenas que pueden impactan negativamente en la microbiota. Además, se ha demostrado que las bacterias pertenecientes a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los taxones con mayor abundancia en la microbiota, estos presentan características benéficas ayudando a combatir infecciones causadas por microorganismo patógenos (**Clavijo & Flórez, 2018**). Las investigaciones enfocadas en el estudio de la microbiota intestinal de las aves a través de análisis metagenómico permite establecer la alfa y beta diversidad y la abundancia relativa de los OTU's presentes en la microbiota intestinal de los pollos.

En base a lo mencionado, la presente investigación plantea realizar un análisis metagenómico de la influencia de la calidad del agua sobre la microbiota intestinal presente en las heces de pollos de engorde en la empresa Grupo Casa Grande. Los resultados obtenidos servirán para afirmar o descartar que el agua es el principal factor que está ocasionando alteraciones en el tracto gastrointestinal (TGI) en las aves.

1.1.2 Importancia de la avicultura en el Ecuador

La industria de la avicultura en el Ecuador representa un sector que a lo largo de los años se ha desarrollado gradualmente, convirtiéndose en uno de los más productivos. Según la **CONAVE (2021)**, el pollo es la principal proteína de consumo en el país representando un 41% (30 Kg/persona/año). Los pollos de engorde se crían específicamente para la producción de carne o huevos y requieren un manejo nutricional y sanitario específico, para obtener un adecuado potencial genético, una mayor rentabilidad y una producción eficiente (**Tizard et al., 2019**).

La Agencia de Regulación y Control Fito y ZooSanitario (Agrocalidad) proporciona estándares y requerimientos de buenas prácticas avícolas que deben cumplir las granjas avícolas, con la finalidad de establecer un control sanitario eficaz con los requerimientos mínimos de inocuidad que deben cumplirse en las instalaciones, así como para el manejo de los alimentos balanceados y la calidad del sistema de distribución de agua (**Agrocalidad, 2023**).

El factor del tipo de alimentación y la calidad del agua de consumo aviar, son uno los criterios más relevantes que pueden alterar la microbiota de las aves (**Vega et al., 2022**). El agua y los balanceados de mala calidad pueden funcionar como vehículos de contagio de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, ocasionando una disbiosis microbiana debido a la presencia de bacterias distintas a las que habitualmente se encuentran en el TGI, provocando una deficiente conversión del alimento y una reducción de la ganancia de peso diaria (**Alvarado & Hernández, 2023**).

Grupo Casa Grande es una empresa dedicada a la industria avícola, cuenta con 4 unidades encargadas de diversas funciones: El Troje (fábrica de balanceado) Pura pechuga (venta de carne de pollo) Yema dorada (venta de huevos) Bigo (granjas de pollos de engorde y reproductoras) Fertiplus (producción de fertilizante). La empresa cumple con todo los requerimientos de funcionamiento establecidos por Agrocalidad, sin embargo, se han visto en la necesidad de realizar un análisis a profundidad de la calidad de agua y la influencia que esta tiene en microbiota de los pollos de engorde de las granjas San José y Las Orquídeas, que se encuentran ubicadas en la parroquia Madre Tierra, con la finalidad de mejorar la productividad de las aves y verificar si el factor que se asume tiene o no algún efecto en el rendimiento de las aves.

1.1.3 Características de los pollos de engorde de la línea genética Cobb 500 broiler

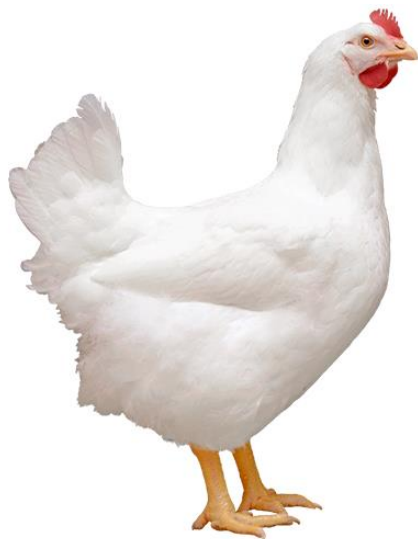
Existen dos líneas genéticas de pollos de engorde (Tabla 1) empleadas en la industria avícola ecuatoriana, sin embargo, la más utilizada es la raza pollo Cobb 500 desarrollada por la empresa Cobb-Vantress. Este tipo de raza es criada específicamente para la producción de carne (**Cobb Vantress, 2022**).

Cobb 500 se caracteriza por presentar rápido crecimiento con una buena conversión de alimento en carne, alimentación de menor costo con un rendimiento superior y uniformidad de los pollos para el procesamiento. Las características de esta línea genética se convierten en una ventaja competitiva, por presentar principalmente un

menor costo por kilogramo o libra de peso vivo producido, por lo que, es una opción viable tanto para los productores como para los consumidores (Cobb Vantress, 2022).

Figura 1

Pollo de engorde Cobb 500.



Fuente: (Cobb Vantress, 2022)

Tabla 1. Principales líneas genéticas de aves productoras de carne (engorde) empleadas en la industria avícola ecuatoriana.

Línea genética	Características	Cita
Ross 308	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta resistencia a las enfermedades metabólicas como Ascitis o Muerte súbita - Capacidad de adaptación en climas cálidos y fríos 	(Ross, 2018)
Cobb 500	<ul style="list-style-type: none"> - Rendimiento de producción de 2.4 kg a los 42 días con una conversión alimenticia de 1.7 kg de alimento por kg de carne. - Menor costo de peso vivo producido - Rendimiento de producción de 2.6 a 3.5 kg a los 41 días con una conversión 	(Cobb Vantress, 2022)

alimenticia de 1.81 kg de alimento por kg de carne.

- Alimentación más eficiente
- Excelente tasa de crecimiento
- Mejor uniformidad de pollos para el procesamiento
- Criador competitivo con un costo de alimentación bajo y rendimiento superior a la línea genética Ross 308.
- Bajo porcentaje de mortalidad 5.67 %

Nota: En un estudio realizado por **Awad et al. (2020)**, se ha evidenciado que la línea Cobb 500 es más eficiente que Ross 308, debido a que presentan una diferencia en la conversión alimenticia y ganancia de peso a menor edad.

1.1.4 Microbiota de los pollos de engorde

La microbiota intestinal es considerada una comunidad microbiana completa, que incluye microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que habitan dentro de organismos multicelulares complejos. Esta microbiota incluye bacterias, arqueas, hongos, protistas y virus (**Silvestre & Torrado, 2018**). En un estudio realizado por **Yan et al. (2022)**, las principales filos bacterianos con mayor abundancia identificados en la microbiota de los pollos de engorde son: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

En la actualidad los estudios sobre la importancia de la microbiota en la salud animal, consiste en realizar análisis para descubrir relaciones entre la microbiota, el huésped y el medio ambiente (**Clavijo et al., 2022**). Los avances biotecnológicos han permitido estudiar la microbiota de los animales, a través de técnicas bioinformáticas facilitando la obtención de la abundancia relativa de las unidades taxonómicas operativas (OTU's) presentes en la microbiota intestinal (**García et al., 2020**).

La microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos de engorde cumple un papel fundamental, ya que tiene un impacto positivo en el sistema inmunológico, la

fisiología del TGI y la productividad del animal (Dittoe et al., 2022). Asimismo, la microbiota de los pollos de engorde se ve involucrada, en la reducción y prevención de la colonización por patógenos entéricos, esto se debe a que forma una especie de barrera protectora (De Cesare et al., 2018).

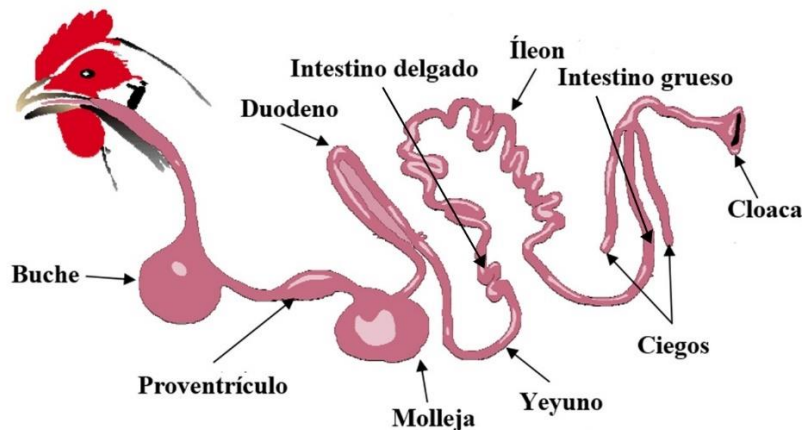
De acuerdo con Ballou et al. (2016), los pollos son colonizados por especies bacterianas al día siguiente de la eclosión, se ha encontrado una pequeña cantidad de bacterias gramnegativas como *Salmoella*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Escherichia coli*. La colonización temprana del intestino por microbios es crucial ya que puede afectar la morfología y fisiología del intestino y la susceptibilidad a las infecciones (Guo et al., 2023).

Las bacterias benéficas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus* que habitan en la microbiota producen vitaminas (K y grupos B), ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico), ácidos orgánicos (ácido láctico) y compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) que inducen respuestas inmunitarias no patogénicas, brindan nutrición y protección al animal (Shang et al., 2018). Sin embargo, el microbioma gastrointestinal también puede ser una fuente de bacterias con características patógenas encontradas en concentraciones bajas como *Salmonella* y *Campylobacter*, que pueden diseminarse a los humanos o actuar como un grupo de resistencia, por tanto, pueden representar una grave amenaza para la salud pública (Clavijo & Flórez, 2018).

El tracto gastrointestinal de los pollos incluye el buche, el proventrículo, la molleja, el duodeno, el yeyuno, el íleon, los ciegos, el intestino grueso y la cloaca (Figura 2). Cada sección presenta diferentes funciones metabólicas que forman a las comunidades microbianas (Tabla 2). Se ha evidenciado que el número y variedad de bacterias varían a lo largo de los segmentos intestinales siendo el ciego la región que presenta una mayor diversidad microbiana 10^{11} Unidades formadoras de colonias (UFC)/g seguido del íleon el cual puede alcanzar hasta 10^9 UFC/g (Alvarenga et al., 2023).

Figura 2.

Partes del tracto gastrointestinal (TGI) de los pollos.



Fuente: Modificado de (Clavijo & Flórez, 2018)

Tabla 2. *Distribución espacial de los taxones bacterianos más comunes y abundantes en el tracto gastrointestinal de pollos.*

Localización TGI (por g de contenido)	pH	Filos Bacterianos	Géneros Bacterianos	Fuente
Buche	5.5	Fimicutes	<i>Lactobacillus</i>	(Gong et al., 2007)
		Antinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	
		Proteobacteria	<i>Enterobacter</i>	
Molleja	2.5	Firmicutes	<i>Lactobacillus,</i>	(Gong et al., 2007)
	a		<i>Enterococcus</i>	
	3.5			
Intestino delgado	6.5 a 7.0	Firmicutes/ Bacterias Gram positivas	<i>Weisella,</i> <i>Turicibacter</i>	(Kumar et al., 2018)
		<i>Enterocaccaceae,</i> <i>Clostridium,</i>		
		Citofago/ Flexibacter/ Bacteroides/ Alto	<i>Bacteroidetes,</i> <i>Flavibacterium,</i> <i>Fusobacterium,</i>	

		G + C, bacterias Gram positivas	<i>Bifidobacterium</i>	
		Protobacteria	<i>Ochrobacterium,</i> <i>Alcaligenes,</i> <i>Escherichia,</i> <i>Campylobacter,</i> <i>Hafria, Shigella</i>	
		Actinobacteria/ Cyanobacteria	<i>Corynebacterium</i>	
		Arqueas metagenómicas (0.81 %)	<i>Methanobrevibacter,</i> <i>Methanopyrus,</i> <i>Methanococc</i>	
		Firmicutes/ Bajo G + C, bacterias Gram positivas (44 – 56 %)	<i>Anaerotuncus,</i> <i>Ruminococcus,</i> <i>Lachnospiraceae,</i> <i>Clostridium,</i> <i>Streptococcus</i>	
Ciego	6.9	Bacteroides/ Citofago/ Flexibacter/ Bacteroides/ Alto G + C, bacterias Gram positivas (23 – 46 %)	<i>Bacteroidetes,</i> <i>Alistipes,</i> <i>Fusobacterium,</i> <i>Bifidobacterium,</i> <i>Flavibacterium,</i> <i>Odoribacter</i>	(Siegerstetter et al., 2017)
		Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>	
		Proteobacteria (1 – 16 %)	<i>Ochrobacterium,</i> <i>Alcaligenes,</i> <i>Escherichia,</i> <i>Campylobacter</i>	
Intestino grueso	>7.5	Firmicutes Proteobacteria	<i>Lactobasillus</i> <i>Escherichia</i>	(Gong et al., 2007)

Nota: El pH y la comunidad bacteriana varía dependiendo de la parte del TGI.

1.1.5 Factores que alteran el microbioma de los pollos

1.1.5.1 Alimentación

La alimentación es un factor relevante que tiene influencia directa en la composición de la microbiota intestinal de los pollos (**Kers et al., 2022**). Según un estudio realizado por **Babatunde et al. (2021)**, afirma que la dieta de las aves de crianza específicamente enfocadas a la producción de carne de consumo debe ser de carácter monogástrica y se compone de varios ingredientes, mismos que, suministran energía y nutrientes esenciales necesarios para el correcto desarrollo y crecimiento de las aves. La harina de maíz, la soja, el trigo, la cebada, la haría de arroz, el afrecho y el palmiste, son unos de los principales componentes alimentarios empleados en las formulaciones de los diversos balanceados de engorde, esto se debe a las propiedades nutricionales benéficas que estos presentan, aportando un 65% de energía metabolizable y aproximadamente el 20 y 30 % de proteína y aminoácidos al ave (**Olukomaiya et al., 2019**).

Ravindran & Reza Abdollahi (2021), afirman que la adición de fibras dietéticas como el salvado de trigo y el maíz que son polisacáridos vegetales resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas, favorecen el crecimiento de microorganismos benéficos encargados de generar un ambiente inhóspito para los posibles patógenos. El maíz favorece un bajo porcentaje en la microbiota de clostridios, enterococos y lactobacilos de guanina más citosina, por su parte el trigo favorece un alto porcentaje de bifidobacterias de guanina más citosina (**Shang et al., 2018**).

La fibra dietética (FD) se puede dividir en dos grupos: la fibra soluble, que incluye a los análogos de carbohidratos, oligosacáridos resistentes, polisacáridos no amiláceos (PNA) solubles, mientras que la fibra insoluble agrupa a los PNA insolubles y sustancias asociadas: lignina, fitatos, cutinas, suberinas, ceras, saponinas, compuestos fenólicos. La utilización de las FD soluble e insoluble en cantidades equilibradas, ayuda a mejorar la salud y productividad de los pollos (**Zhang et al., 2023**).

La fibra, puede ser empleada por la microbiota intestinal, siempre y cuando presente las enzimas correctas para romper los enlaces químicos que forman su estructura

(Tejeda & Kim, 2021). Esta ruptura dependerá del contenido genético de las bacterias y otros microorganismos presentes. Mientras más diversa sea la microbiota intestinal, la capacidad para descomponer la fibra aumenta (Mahmood & Guo, 2020).

La ingesta de un alimento de calidad estimula el desarrollo adecuada microbiota intestinal incluyendo: alargamiento de las vellosidades, proliferación de criptas, aumento de la actividad enzimática, secreción de moco y desarrollo de enterocitos (Kim et al., 2022). Además de la composición que debe tener el balanceado que será suministrado al ave, es importante tomar en cuenta: la calidad de la materia prima con la que se elabora, esto se debe a que la mayoría de los granos procesados, son susceptibles a contaminantes físicos (residuos plásticos, vidrios o metales) químicos (pesticidas) y microbiológicos (hongos y bacterias fitopatógenas) (Ducatelle et al., 2023).

La forma del alimento (peletizado, triturado o harinado) y el tamaño de la partícula que ingiere el ave depende de varios factores, como la edad del lote y la formulación del alimento (Alshamy et al., 2018). Las partículas pequeñas favorecen a que las enzimas digestivas y las secreciones cumplan con el objetivo de mejorar la absorción de nutrientes y son consideradas más fáciles de digerir (Fathima et al., 2022). Por otro lado, se cree que las partículas más grandes se retienen en el tracto gastrointestinal por un tiempo más prolongado, ayudando a liberar más almidón presente en los granos de los cereales de la composición del alimento, lo que facilita la fermentación bacteriana (Alyileili et al., 2020).

En un estudio realizado por Shang et al. (2018), afirma que el consumo de alimentos harinados en los pollos de engorde reduce el número de bacterias del género *Enterococcus spp.* en la microbiota intestinas, pero aumenta el número de *Lactobacillus spp* y *Clostridium perfringens*.

La eficiencia alimenticia no solo influye en la genética y el estado fisiológico del huésped, sino también en la microbiota intestinal, alterando la digestión de nutrientes y la absorción de energía del huésped. Jha & Mishra (2021), verificaron la diferencia entre las comunidades microbianas de pollos de engorde con buena y mala eficiencia

alimenticia utilizando muestras fecales. En el grupo de baja eficiencia, predominaron las bacterias del género: *Acinetobacter*, *Anaerospobacter* y *Arcobacter*, mientras que, *Escherichia/Shigella*, *Faecalibacterium* y *Helicobacter* fueron las bacterias encontradas en las aves que presentan una mayor eficiencia. La presencia de *Lactobacillus* y *Bacteroides* fueron similares en ambos grupos (Yan et al., 2017).

1.1.5.2 Calidad del agua

En la industria avícola la calidad del agua cumple un papel importante en el metabolismo de los pollos de engorde, sirve como medio de transporte de nutrientes, interviene en la regulación de la temperatura corporal, actúa como lubricante en las articulaciones, y se considera como un factor que influye en el mantenimiento de la homeostasis de las aves para el desarrollo de los procesos vitales (Gieco et al., 2020). Las aves por lo general beben un equivalente al 1.6-2 veces el peso del alimento consumido, por lo que, si la calidad de agua suministrada a las aves es deficiente, el consumo de esta se verá disminuido (H&N International, 2022).

Existen dos factores importantes que influyen en la calidad del agua, mismos que son: los factores microbiológicos, estos pueden ser agentes infecciosos que causan enfermedades a las aves (Plata Esparza, 2020). En estudios realizados por Watkins (2019), menciona que se han aislado patógenos de agua de consumo aviar sin tratamientos entre los cuales destacan los géneros: *Escherichia*, *Pasteurella*, *Mycoplasma*, *Bordetella*, *Salmonella* y *Haemophilus*. Por otro lado, el análisis de los factores físico-químicos son de vital importancia debido a que, la presencia de ciertos macrominerales y oligoelementos en concentraciones elevadas pueden causar efectos laxantes, alteración del sabor del agua, retrasos en el crecimiento y disminución de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre (Zambrano Ponce, 2019).

Los principales parámetros de estudio requeridos según el manual Cobb Vantress (2022), son: *Escherichia coli* y bacterias coliformes en cuanto a parámetros microbiológicos y calcio, cloro, cobre, hierro, cromo, magnesio, nitrato, sulfato, zinc y sodio en cuanto a parámetros físicoquímicos. El análisis de estos parámetros permite conocer cambios en la calidad de agua a lo largo del tiempo ayudando a llevar un

control rutinario de la misma, de esta manera se evitan las complicaciones en la producción avícola y se mejora el rendimiento del ave. El agua para el consumo aviar puede ser captada de diversas fuentes, de acuerdo con **Boumedous et al. (2017)**, se encontró que la mayoría de las granjas avícolas ecuatorianas se abastecen de agua por medio del suministro de la red de agua municipal de su sector, de captaciones cercanas y de pozos.

En el caso de la empresa Grupo Casa Grande el suministro principal de agua para las Granjas de San José y las Orquídeas ubicadas en el sector Madre Tierra perteneciente a la provincia de Pastaza provienen de pozos. El agua de pozo es extraída por medio de bombeo mecánico y posteriormente es sometida a un proceso de potabilización. El agua de pozo se caracteriza por presentar niveles elevados de hierro, metales pesados, químicos orgánicos, junto con nitratos, minerales como calcio y magnesio que producen dureza del agua (**El Sabry et al., 2023**).

De acuerdo con **Li et al. (2023)**, si el agua no es tratada de manera adecuada la calidad del agua que los pollos de engorde consumen puede impactar directamente en la composición y la salud de esta microbiota. En un estudio realizado por **Clavijo & Flórez (2018)**, menciona que los contaminantes presentes en el agua, como los pesticidas, los metales pesados y los productos químicos industriales, pueden llegar al intestino a través del consumo de agua y alimentos contaminados. Estos compuestos pueden alterar el equilibrio de la microbiota, reduciendo la abundancia de bacterias benéficas de los siguientes género: *Lactobacillus* y *Bifidubacterim* y fomentando el crecimiento de bacterias potencialmente patógenos del género: *Clostridium*, *Streptococcus* y *Escherichia* produciendo una disbiosis (**Aruwa et al., 2021**).

1.1.5.3 Administración de antibióticos y probióticos

Los antibióticos de amplio espectro se han empleado a lo largo de los años como uno de los principales tratamientos de enfermedades bacterianas. La salmonelosis y la enteritis necrótica causadas por *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*, son considerados como las enfermedades más importantes asociadas a grandes pérdidas económicas en la industria avícola a nivel mundial (**Roth et al., 2019**). Este

tipo de patógenos son transmitidos a las aves a través de los alimentos, causando un declive en el rendimiento del pollo de engorde (**Adetunji et al., 2022**). Por este motivo las granjas avícolas han visto la necesidad de administrar antibióticos a las aves, siendo los más utilizados: penicilina G, bacitracina, neomicina, gentamicina, estreptomina, tetraciclina, eritromicina y florfenicol (**Mehdi et al., 2018**).

De acuerdo con **Robinson et al. (2019)**, argumentan que los antibióticos generan alteraciones en las comunidades de la microbiota intestinal y en las vías metabólicas de los pollos de engorde. Estos cambios afectan la capacidad taxonómica, genómica y funcional de la microbiota, reduciendo la diversidad bacteriana. El impacto que el antibiótico genera en la microbiota depende de la dosis, el tipo de antibiótico y el periodo de suministro. Los antibióticos a demás causan, cambios en los perfiles metabólicos microbianos en pollos, con efectos persistentes que impiden el regreso a la comunidad original y lleva a la formación de una nueva comunidad (**Le Roy et al., 2019**).

En la investigación realizada por **Elokil et al. (2020)**, se evidencia que la abundancia de las comunidades microbianas específicamente de los pertenecientes a los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Thermi* y *Verrucomicrobia*, así como las familias *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *S24-7* y *Corynebacterium*, disminuyeron en la microbiota intestinal de los pollos de engorde tras haber sido administrados los antibióticos enrofloxacina y diclazuril modificó la composición de la microbiota intestinal. Los disminución de la abundancia bacteriana en la microbiota, altera la fisiopatología de las infecciones por parásitos, generando resistencia antimicrobiana o facilitando la propagación de infecciones causadas por microorganismos patógenos que se aprovechan de la disbiosis a nivel de la microbiota (**Li et al., 2017**).

Para reducir los efectos negativos de los antibióticos se ha llegado a emplear los probióticos, estos son conocidos como microorganismos benéficos, ayudan a mejorar la salud de los animales (**Elbaz & El-sheikh, 2020**). En la industria avícola el uso de probióticos es de suma importancia debido a que mediante exclusión competitiva se puede llegar a mantener normal la microflora intestinal, generando efectos beneficiosos sobre el metabolismo ya que ayuda a aumentar las actividades de las

enzimas digestivas, mejora la digestibilidad de los nutrientes y mejora el sistema inmunológico **(Chen et al., 2022)**.

Sin embargo, a comparación de los antibióticos los probióticos reducen los patógenos, pero no los eliminan demostrando que estos sustitutos no pueden ser empleados para tratar algunas enfermedades como las causadas por *Clostridium* o *Salmonella* puesto que son difíciles de eliminar **(Ye et al., 2021)**.

Según **She et al. (2018)**, menciona que en la industria avícola los probióticos más empleados son *Bacillus spp.*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces*.

1.1.5.4 Clima y ubicación geográfica

El clima y la ubicación geográfica de los galpones de pollos de engorde influye en el desarrollo de estos. Se han realizado estudios relacionados utilizan la secuenciación del amplicón del gen 16S rRNA, para determinar el grado de impacto que tiene el clima sobre la microbiota del ave, sin embargo, la información es limitada **(Rychlik et al., 2023)**. El estrés por calor genera efectos negativos en el rendimiento de la producción, además altera la composición microbiana del ave. Estas alteraciones pueden causar susceptibilidad al desarrollo de *E. coli* y pueden favorecer a una elevada colonización intestinal por *Salmonella* **(Kers et al., 2018)**.

Cuando las aves se encuentran expuestas a altas temperaturas por más de 24 horas, llegan a presentar estrés **(Viso et al., 2021)**. Esto ocasiona cambios en la composición microbiana del íleon en comparación con muestras cecales, lo que indica que la microbiota en el íleon suele ser más sensible a los cambios que la microbiota cecal. Esto se debe a que los microorganismos que habitan en TGI, dependiendo de su ubicación, se encuentran a diferentes pH, en el caso del íleon el pH es de 7 a 7.5 (neutro o ligeramente alcalino), al aumentar la temperatura ambiental también aumenta la temperatura corporal del ave, alterando el pH lo que hace que este disminuya, volviéndolo ácido, reduciendo la carga microbiana presente en el íleon **(Kers et al., 2019)**.

1.1.6 Análisis metagenómico

El análisis de datos metagenómicos proporciona información de la cantidad y la variabilidad de los géneros bacterianos presentes en la microbiota intestinal de las aves, representa una forma de identificar nuevos organismos que no han sido identificado por medio de la microbiología clásica debido a que son microorganismos no cultivables que están presentes en una muestra ambiental o fecal (**Breitwieser et al., 2018**).

Una de las principales funciones de este tipo de análisis es conocer las relaciones filogenéticas, la taxonomía y la abundancia de especies en una comunidad microbiana, por medio de la secuenciación de amplicones 16S, 18S e ITS o a su vez, mediante la secuencian metagenómica de escopeta, lo que permite comparar los grupos taxonómicos de microorganismos conocidos en una base de datos (**Navgire et al., 2022**).

La aplicación de la secuenciación metagenómica de amplicon del gen 16S rRNA es una de las más empleada en estudios relacionados a la determinación de la composición de la microbiota intestinal, esto se debe a que según **Johnson et al. (2019)**, permite obtener la composición de las comunidades microbianas a partir de la comparación con bases de datos y el análisis filogenético específicamente de bacterias. Esta técnica permite identificar de cepas bacterianas a nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie (**Qi et al., 2019**).

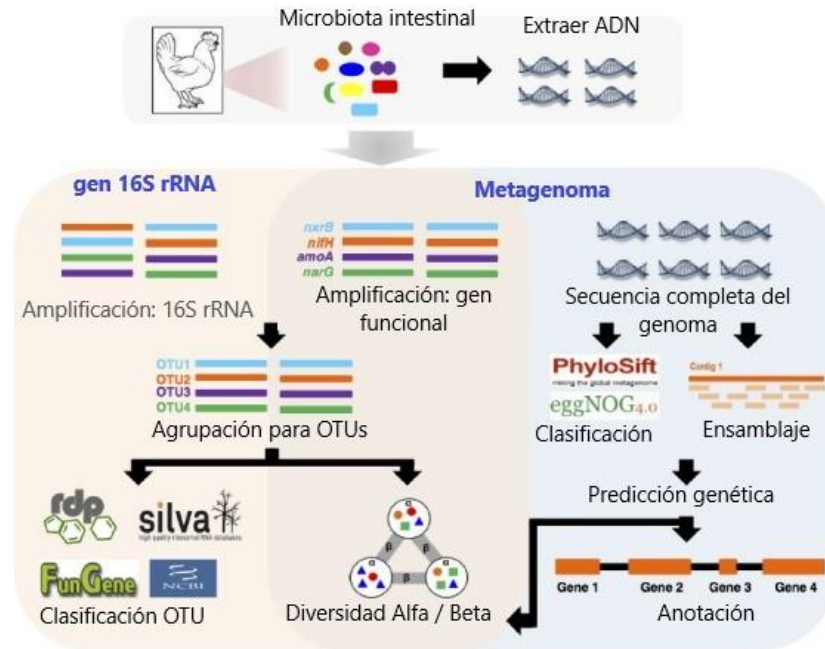
El gen 16S rRNA se encuentra presenta en la gran mayoría de especies bacterianas y sirve para identificar la especie y la diferencia entre bacterianas estrechamente relacionadas (**Cuccato et al., 2021**). Además, este gen presenta regiones conservadas y variables, donde las áreas conservadas reflejan relaciones filogenéticas entre especies y las regiones altamente variables que reflejan diferencias entre especies (**Weinroth et al., 2022**).

Uno de los objetivos principales en el análisis metagenómico es convertir datos limpios en tablas taxonómicas y funcionales empleando métodos basados en lecturas y/o

ensamblajes, para esto se utilizan softwares bioinformáticos que permiten analizar datos de secuencias de ADN en bruto (Liu et al., 2021).

Figura 3.

Análisis metagenómico por amplicon del gen 16S rRNA.



Fuente: Modificada de (Choi et al., 2015).

1.1.6.1 Diversidad de la microbiota Alfa y Beta

Los archivos de salida más importantes que se obtienen en el análisis metagenómico son las tablas taxonómicas y funcionales (Liu et al., 2021). La visualización general se puede utilizar para estudiar la diferencia entre la diversidad alfa/beta y la composición taxonómica en una tabla de características (Navgire et al., 2022).

La diversidad alfa se refiere a la diversidad a escala local, describiendo la diversidad de especies (riqueza) dentro de una comunidad. Por otro lado, la diversidad beta describe la cantidad de diferenciación entre las comunidades de especies (Liu et al., 2021). A diferencia de los otros niveles de diversidad de especies, la interpretación y cuantificación exactas de la diversidad beta varía sustancialmente entre los estudios (Andermann et al., 2022).

Es importante conocer la relevancia de la composición taxonómica ya que esta describe la microbiota presente en una comunidad microbiana. Para simplificar, los resultados del estudio de la microbiota se muestra el filo o género de los microorganismos en el gráfico (**Laudadio et al., 2019**). La comparación de diferencias por su parte se utiliza para identificar características como: especies, genes o rutas que presentan abundancias significativamente diferentes entre grupos. Otro método de interpretación de datos es el análisis de correlación que se utiliza para revelar las asociaciones entre taxones y metadatos de muestra (**Navgire et al., 2022**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Analizar la influencia de la calidad de agua sobre la microbiota intestinal presente en las heces de pollos de engorde de la empresa Grupo Casa Grande.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar los puntos para la toma de muestras de agua en dos diferentes granjas siguiendo el protocolo de muestreo establecido en la norma NTE INEN 1108.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la calidad del agua de consumo aviar en base al manual de manejo de pollos COBB.
- Desarrollar un análisis metagenómico de la microbiota intestinal de pollos de engorde para la obtención de la composición taxonómica de las comunidades microbianas.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Equipos de laboratorio

Tabla 3. *Equipos de laboratorio.*

DETALLE	CANTIDAD
Refrigerador 3628255	1
Balanza analítica 321562	1
Incubadora 362853	1
Cámara de flujo laminar 8758883	1
Fotómetro multiparamétrico Hanna HI 83399	1
Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito 8749766	1
Autoclave 3628267	1
Microcentrífuga 4112181	1
Vortex 2667779	1
Ultracongelador 8751515	1

2.1.2 Instrumentos de laboratorio

Tabla 4. *Instrumentos de laboratorio.*

DETALLE	CANTIDAD
Frascos ámbar 1L	18
Frascos ámbar 0,5L	18
Frascos estériles	36
Coolers	4
Balón de aforo de 250 mL	18
Balón de aforo de 25 mL	18
Balón de aforo de 20 mL	18
MC-media PAD	18
Guantes estériles	1 paquete

DETALLE	CANTIDAD
Micropipeta	2
Puntas de micropipeta 200 μ L	1 funda
Puntas de micropipeta 1000 μ L	1 funda
Matraz Erlenmeyer de 100 mL	18
Espátula	1
Gradilla	1
Papel aluminio	1
Vasos de precipitación 50 mL	18
Probeta de 10 mL	3
Nitrogeno líquido	1 cilindro
Microtubos 2 μ L	1 funda
Isopos o palillos	1 caja
Cajas para muestras de heces	1 funda
Cajas para ultracongelador	1 caja

2.1.3 Reactivos de laboratorio

Tabla 5. *Reactivos de laboratorio.*

DETALLE	CANTIDAD
Kit Nitrato	1
Kit Sulfato	1
Kit Hierro	1
Kit Magnesio	1
Kit Calcio	1
Kit Cloro libre	1
Kit Zinc	1
Kit Cobre	1
Nitrógeno líquido	1

2.2 Métodos

2.2.1 Identificación de los puntos para la toma de muestras de agua en dos diferentes granjas siguiendo el protocolo de muestreo establecido en la norma NTE INEN 1108

2.2.1.1 Tipo de Muestreo

Se realizó un muestreo simple en 3 diferentes puntos de las granjas “San José” y “Las Orquídeas” pertenecientes a la parroquia Madre Tierra. Para el ingreso únicamente se requirió la autorización de los dueños de las granjas (Anexo 3). El muestreo se dio desde los pozos de agua que es el lugar de toma principal, después de salir de la planta de tratamiento y en los bebederos de consumo del animal. Las muestras recolectadas fueron analizadas por triplicado y se presentaron por medio de una interpretación estadística, ya que no se tuvo un diseño experimental por el tipo crítico del proyecto. Por lo cual, se obtuvieron los datos y se compararon con la Norma NTE INEN 1108 de agua potable y el Manual de Manejo de pollos COBB.

2.2.1.2 Recolección de la muestra

Se recolectó en los puntos establecidos, un litro de agua superficial en botellas ámbar y en recipientes estériles; en los puntos establecidos se sumergió la botella a 0,3 m de profundidad por debajo de la superficie del agua. Finalmente, cada una de las muestras fueron etiquetadas de acuerdo con el lugar establecido.

2.2.1.3 Conservantes, transporte y almacenamiento

Para la adecuada conservación de las muestras se utilizó los preservantes establecidos en la Normas del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) 1108, sin sobrepasar los días de almacenamiento recomendados para el análisis. Las muestras se transportaron y colocaron en contenedores a temperatura de 4°C hasta llegar a los laboratorios de la FCIAB de la Universidad Técnica de Ambato. Finalmente, se almacenó en un refrigerador en la oscuridad, para su posterior análisis.

2.2.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la calidad del agua de consumo aviar en base al manual de manejo de pollos COBB

2.2.2.1 Análisis de las propiedades fisicoquímicos

pH

Para medir el pH *in situ* primero se calibró el pHmetro, para esto se colocó en un vaso de precipitación una solución tampón pH=7, se sumergió el electrodo a 2 cm del vaso, se agitó suavemente hasta que apareció la lectura y se estabilizó a 7. Posterior a esto se lavó el electrodo con el frasco lavador, se vertió el agua del lavado en un cristizador, se lo secó cuidadosamente. Después se colocó en otro vaso de precipitación una solución tampón pH=4, se sumergió el electrodo a 2 cm del vaso, se agitó suavemente hasta que aparezca la lectura y se estabilice a 4.

Una vez calibrado el equipo, se colocó las muestras de agua en vasos de precipitación, se sumergió el electrodo unos dos centímetros y se agitó suavemente hasta que aparezca la lectura del pH en la pantalla. El procedimiento se repitió para cada una de las muestras.

Calcio

Se seleccionó el método calcio en el fotómetro multiparamétrico HANNA, en cubetas se colocó 3 mL de las muestras no reaccionadas con la ayuda de una jeringa de 5 mL. Se usó una pipeta para poder colocar 10 mL del reactivo calcio A HI93752A-Ca, posteriormente se añadió 4 gotas del reactivo solución tampón. Después se colocó la tapa y se invirtió varias veces hasta mezclar los reactivos. Se colocó la cubeta en el soporte y se presionó cero y se esperó a que el indicador llegue a -0,0-. Se retiró la cubeta, con la ayuda de una jeringa se añadió 1 mL del reactivo calcio HI 93752B-Ca a cada una de las muestras, nuevamente se invirtió la cubeta hasta que el reactivo se mezcló. Se colocó la cubeta en el instrumento, se presionó el temporizador Timer y se esperó 5 minutos, después de ese tiempo se retiró la cubeta y se invirtió nuevamente por aproximadamente 15 segundos. Finalmente se colocó la cubeta nuevamente en el

instrumento hasta que se realizó la lectura, el resultado apareció en mg/L de calcio Ca^{2+} (HANNA Instruments, 2022).

Magnesio

En el fotómetro multiparamétrico HANNA se seleccionó el método magnesio, después con la ayuda de una jeringa se agregó en la cubera 1 mL del reactivo magnesio A HI 93752^a-Mg con la ayuda de una pipeta se llenó la cubera hasta la marca con 10 mL del reactivo magnesio HI 93752B-Mg. Posteriormente se colocó la tapa a la cubeta y se invirtió varias veces para que los reactivos se mezclen. Se colocó la cubera en el soporte y se cerró la tapa. Se presionó la tecla cero y se esperó a que el indicador en la pantalla aparezca en -0,0-. Se retiró la cubeta y se agregó 0,5 mL de las muestras con la ayuda de otra jeringa. Se colocó la tapa y se invirtió hasta que todo se haya mezclado. Nuevamente se colocó la cubeta en el instrumento y se cerró la tapa. Finalmente se presionó el temporizador Timer, después de 15 segundos se presionó el botón Read y se esperó hasta que el instrumento realice la lectura (HANNA Instruments, 2022).

Dureza total

Para determinar la dureza se calculó a partir de los resultados de las determinaciones separadas de calcio y magnesio. Para esto se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{CaCO}_3/\text{L} = 2.497 [\text{Ca}, \text{mg/L}] + 4.118[\text{Mg}, \text{mg/L}]$$

Cloro libre

Para la determinación de cloro libre se empleó el fotómetro multiparamétrico HANNA, cada muestra se llenaron en una cubeta de 10 ml. Luego se colocó la cubeta en el soporte del fotómetro, posterior a ello, se presionó el botón cero y se esperó el tiempo indicado por el temporizador para medir. Se retiró la cubeta y se agregó 1 paquete de reactivo de cloro libre HI93701-0, seguido de esto, se colocó el tapón y se mezcló la solución durante 20 segundos. Finalmente se colocó la cubeta en el

fotómetro y se esperó el tiempo indicado en el temporizador para leer el resultado en mg/L Cloro Cl₂ (**HANNA Instruments, 2022**).

Cobre

Para la determinación de cobre en el agua se empleó el fotómetro multiparamétrico HANNA, para ello se llenó la cubeta con 10 ml de cada muestra no reaccionada hasta la marca y luego se colocó la tapa, después se ubicó la cubeta en el soporte del equipo y se presionó la tecla cero para que el medidor se encuentre preparado para la medición. Luego se retiró la cubeta y se agregó 1 paquete de reactivo Cu HI93702-01, se agitó vigorosamente por 10 segundos y se colocó nuevamente en el equipo. Se esperó el tiempo indicado en el temporizador del equipo para la medición y luego se realizó la lectura en las unidades indicadas en mg/L del metal (**HANNA Instruments, 2022**).

Hierro

Para el procedimiento de determinación de hierro se utilizó el fotómetro multiparamétrico HANNA para ellos se llenó 1 cilindro de mezcla graduado con 25 mL de agua desionizada, después se agregó 1 paquete de reactivo hierro HI 93746-0, se cerró el cilindro y se agitó vigorosamente por 30 segundos, siendo esta la solución el blanco, seguido de ello, se llenó la cubeta con 10 mL del blanco (hasta la marca) y se colocó nuevamente la tapa, posterior a ello, se colocó la cubeta en el soporte y se cerró la tapa. Se presionó la tecla cero que al finalizar la medición mostró en la pantalla del equipo el indicador -0.0-. Una vez calibrado el equipo se retiró la cubeta y se llenó otro cilindro de mezcla graduado con 25 mL de la muestra hasta la marca, después, se agregó 1 paquete de reactivo hierro, HI 93746-0, se cerró el cilindro y se agitó vigorosamente por 30 segundos, siendo esta la muestra reaccionada, a continuación, se llenó la segunda cubeta con 10 mL de la muestra reaccionada y se colocó nuevamente la tapa. Finalmente se introdujo la muestra en el instrumento, se cerró la tapa y se esperó 30 segundos para presionar el botón leer (Read). Cuando el temporizador terminó, el medidor realizó la lectura. El instrumento mostró la concentración en mg /L de hierro (Fe) (**HANNA Instruments, 2022**).

Nitratos

Se seleccionó el método nitrato en el fotómetro multiparamétrico HANNA, después se colocó en cubetas 10 mL de cada muestra, se colocó la cubeta en el soporte y se presionó cero hasta que el indicado muestre -0,0-. Se retiró la cubeta y se agregó 1 paquete del reactivo nitrato HI 93728-0. Se colocó la tapa de la cubeta y se agitó vigorosamente de arriba hacia abajo durante 10 segundos. Se continuó invirtiendo la cubeta por 50 segundos más evitando la formación de burbujas de aire. Posteriormente se colocó la cubeta en el instrumento se presionó la tecla Timer y después la tecla Read. Finalmente se esperó hasta que aparezca la lectura. Los resultados aparecieron en mg/L de nitrato - nitrógeno (NO₃-N). Se presionó la tecla Chem Frm para que se realice la conversión del resultado en mg/L de nitrato (NO₃⁻) (**HANNA Instruments, 2022**).

Plomo

El plomo se determinó empleando un espectrofotómetro de absorción atómica PG Instruments AA500 por horno de grafito (plataforma). La concentración de este elemento se determinó por medio de una señal de absorción integrada y se calculó por medio de un gráfico de calibración preestablecido (**Macha, 2019**).

En vasos de precipitación de TFM o PFA se colocó 40ml de cada una de las muestras. Posteriormente, se agregó 1 ml de HNO₃ y 2 ml de H₂O₂ al 30 % y se tapó con un vidrio de reloj. Con la ayuda de un microondas se realizó una digestión hasta reducir el volumen a la mitad, se filtró las muestras con la ayuda de membranas de 0,45 µm. Estas muestras filtradas se transfirieron a matraces aforados los cuales contenían agua destilada. Este tratamiento fue empleado con la finalidad de asegurar la destrucción de la materia orgánica que puede estar presente en las muestras de agua (**Macha, 2019**).

Los metales disueltos fueron determinados de cada una de las muestras acuosas. Estas muestras se acidificaron con HNO₃ con una proporción de 45 ml de muestra y 5 ml de ácido, posteriormente fueron llevadas al horno microondas en el cual se realizó una digestión. Luego se transfirió el producto a balones de aforo, se realizó varios enjuagues y con agua destilada (**Wu et al., 2023**). Se consideró la programación de

temperatura, límites de detección y la longitud de onda sugeridas en el Analytical Cookbook PG Instruments del espectrofotómetro de absorción atómica AA500 (Tabla 1). Se preparó rectas de calibración, utilizando patrones comerciales (1000 mg/L) (Liang et al., 2020).

Tabla 6. *Parámetros para considerar para la determinación de metales pesados por el método de absorción atómica.*

Metal	Rango de recta de calibración (ppb)	Longitud de onda (nm)	Límite de detección (ppb)
Plomo	0-150	283.30	0.03

Se realizó diluciones consecutivamente a partir de la solución estándar del plomo, preparando soluciones con concentración de 1 mg/L. Las diluciones se acidificaron con ácido nítrico 1% para evitar precipitaciones. Se agitó los balones para homogenizar la solución y se transfirió a los frascos de polipropileno, previamente identificados con el código de la muestra o el estándar (Wu et al., 2023).

Las muestras acuosas preparadas se inyectaron en el tubo de grafito, con un volumen de 10 μ L de blanco, estándar y muestra para obtener 5 mediciones de absorbancia para los estándares y 3 mediciones para las muestras. Luego se analizó las muestras con las operaciones de secado, incineración y atomización del programa de calentamiento. Las mediciones se realizaron por triplicado y se procedió a realizar la lectura de la absorbancia vs concentración en mg/L (Wu et al., 2023).

Sulfatos

Se seleccionó el método sulfato en el fotómetro multiparamétrico HANNA. Posterior a esto se llenó la cubeta con 10 ml de cada muestra. Después se ubicó la cubeta en el soporte del equipo, se presionó la tecla cero y se esperó el tiempo indicado en el temporizador para realizar la respectiva medición. Se retiró la cubeta y se añadió 1 paquete del reactivo sulfato HI93751-0. Se colocó la tapa y se invirtió la solución por 1 minuto para que los reactivos se mezclen. Nuevamente, se colocó la cubeta en el

instrumento y se esperó el tiempo indicado en el temporizador para comenzar con la lectura de los resultados en mg/L de sulfato SO_4^{2-} (**HANNA Instruments, 2022**).

Zinc

Se seleccionó el método zinc en el fotómetro multiparamétrico HANNA, se llenó viales de vidrio graduado con 20 mL de cada una de las muestras, después se colocó 1 paquete del reactivo zinc A HI 93731A-0, se cerró el cilindro y se lo invirtió varias veces hasta que se disolvió por completo. Después se colocó en una cubeta 10 mL de la muestra reaccionada, se la colocó en el soporte y se presionó la tecla cero hasta que el medidor estuvo listo. Luego en la cubeta agregó 0,5 mL del reactivo de zinc B HI 93731B-0, se cerró dicha cubeta con un tampón de plástico HDPE para evitar la contaminación, se colocó la tapa y se mezcló por alrededor de 15 segundos, la muestra se puso en el instrumento y se esperó hasta que aparezca la lectura (**HANNA Instruments, 2022**).

2.2.2.2 Análisis de las propiedades microbiológicas

***E. coli* y Bacterias coliformes**

Para la determinación de presencia de coliformes fecales, se realizó mediante el análisis Media Pad para coliformes, para ello se autoclavó el material y el agua para las diluciones a temperatura de 121°C. Se sacó las muestras y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se preparó diluciones seriadas de ser necesarias; para ello se tomó 1 ml de muestra en 99 ml de agua estéril. Luego se etiquetó cada almohadilla del Media Pad y se realizó el cultivo con cada dilución. Se adicionó un 1 ml de cada dilución levantando con cuidado la película del Media Pad en sentido diagonal, se agregó la muestra en el centro del Pad y se cerró el film en forma diagonal, asegurando que los bordes se encuentren cerrados. Posteriormente se incubó los Media Pads apilándolos en un máximo de 20 a 35- 37°C por 24 horas. Pasado el tiempo indicado, se realizó el recuento de resultados en UFC (Unidades Formadoras de Colonias), se contó los puntos de color de una celda representativa y se multiplicará por 20 (celdas

totales), y se obtuvo una estimación del dato total de la MC-media PAD (Merck KGaA, 2018).

2.2.3 Desarrollo del análisis metagenómico de la microbiota intestinal de pollos de engorde para la obtención de la composición taxonómica de las comunidades microbianas

2.2.3.1 Toma de muestras de heces de las aves

El muestreo de las heces de las aves se realizó en la granja “San José” y en la granja “Las Orquídeas” ubicadas en la parroquia Madre Tierra. Para el ingreso a las granjas no se requirió ningún permiso especial solo la autorización de los dueños. El método para la toma de muestras que se empleó fue el descrito por PANAF TOSA (2017). Para ello se utilizó guantes desechables y contenedores de muestras con espátulas esterilizadas. Se recolectó 4 muestras de heces de pollos de diversos puntos del galpón de las dos granjas, una vez recolectada las muestras, se etiquetó los contenedores y posterior a ello se los transportó en contenedores con hielo seco, para mantener la cadena de frío, a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante un máximo de 24 horas, hasta llegar al laboratorio. Una vez en el laboratorio se tomó 10 gr de cada una de las muestras y se las colocó en tubos Eppendorf etiquetados. Para su conservación las muestras se almacenaron en el ultracongelador a –80 °C.

2.2.3.2 Extracción de ADN

Las muestras se descongelaron y para la extracción del ADN se utilizará el kit MpBio (FastDNA SPIN Kit for Soil) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se agitó brevemente el tubo PowerBead Pro para asegurarse de que las perlas se hayan asentado en el fondo. Posteriormente, se añadió 0,50 g de la muestra de heces, con ayuda de una micropipeta se colocó 800 µl de solución CD1. Se llevó al Vortex brevemente para mezclar. Se fijó el tubo PowerBead Pro horizontalmente en un adaptador Vortex para tubos de 1,5 a 2 ml durante 10 minutos. Después, se centrifugó el tubo PowerBead Pro a 15.000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 ml. Seguido de esto, se centrifugó a 15.000

rpm durante 1 min. Evitando el sedimento, se transfirió 600 µl de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 ml. Se agregó 200 µl de solución CD2 y se agitó durante 5 segundos. Se centrifugó las muestras a 15.000 rpm durante 1 minuto. Evitando el sedimento, se transfirió 600 µl del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 ml. Posteriormente se agregó 600 µl de solución CD3 y se agitó durante 5 segundos. Se tomó 650 µl de lisado en una columna de centrifugación MB y se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto.

Nuevamente se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto y se desechó el flujo. Se repitió los pasos anteriores, para asegurarse de que todo el lisado haya pasado a través de la columna de centrifugación MB. Se colocó con cuidado la columna de centrifugación MB en un tubo de recogida limpio de 2 ml, evitando salpicar el flujo sobre la columna de centrifugado MB. Se agregó 500 µl de solución EA a la columna de centrifugación MB. Se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el flujo y se colocó la columna de centrifugación MB nuevamente en el mismo tubo de recolección de 2 ml. Se agregó 500 µl de solución C5 a la columna de centrifugación MB. Se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 min.

Se desechó el flujo y se colocó la columna de centrifugación MB en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Se centrifugó a 16.000 rpm durante 2 min. Se colocó con cuidado la columna de centrifugación MB en un tubo de elución nuevo de 1,5 ml. Se agregó 100 µl de solución C6 al centro de la membrana del filtro blanco. Finalmente se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 minuto y se desechó la columna de centrifugado MB. El ADN quedó listo para aplicaciones posteriores.

2.2.3.3 Calidad y cantidad de ADN

La concentración de ADN extraído (absorbancia a 260 nm) y su pureza (relación de absorbancia 260/230 y 260/280) se midió con la ayuda de un Nanodrop. Todas las muestras de ADN fueron almacenadas en el congelador a -20 °C para su posterior análisis.

2.2.3.4 Amplificación y secuenciación por PCR

Se realizó la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA mediante PCR con cebadores con código de barras y la secuenciación se realizó en la plataforma Illumina MiSeq.

2.2.3.5 Análisis Bioinformático

Los datos obtenidos de la secuenciación se analizaron en el programa Qiime2 versión 2018.11 (<https://qiime2.org/>). Los resultados de los análisis químicos previamente realizados se colocarán en una meta-data. La meta-data se creó en Google Sheets y se empleará la herramienta Keemei que es un código abierto para validar formatos de archivos bioinformáticos tabulares. Los metadatos se generaron colocando un código en cada muestra, se recopiló la información de los análisis de calidad del agua y datos sobre las aves (edad, sexo, peso, tipo de alimentación). Los metadatos se exportaron en formato .tsv (archivo de texto separado por tabulaciones). Cada tabulación representa una columna. La información indispensable se colocó en las dos primeras dos columnas: id y barcode-sequence.

El id representó la etiqueta con la que se nombró al barcode (código de barras de ADN), es decir esa muestra. El barcode-sequence (secuencia de ADN) como su nombre indica es el barcode al que se asoció la muestra. Se creó una carpeta en la terminal de Qiime2 en la cual se almacenó todos los archivos que se generaron durante todos los análisis. Posterior a ello se descargó los archivos de los meta-datos. Se descargo las secuencias de trabajo. Una vez realizado esto se activó Qiime2 desde la terminal, después se importaron las secuencias y los barcodes al formato .qza el cual se importó con el plugin comando qiime tools import.

Después se hizo un resumen de los datos demultiplexados y se transformaron a un formato de visualización .qzv. Se copio y pegó el cuadro de comando del plugin para hacer el resumen de los resultados del demultiplexing en la terminal, la primera opción es para el archivo de entrada que es el demux.qza del paso anterior, la segunda opción es para generar el archivo de salida llamado demux.qzv, de esta manera se generó el archivo con la extensión .qzv y un histograma del número de secuencias por el número

de muestras, únicamente de las secuencias forward, ya que se trabajó con secuencias paired end.

Las secuencias sin procesar se desmultiplexaron con Qiime2 es decir, se realizó la identificación del barcode de cada secuencia obtenida para agrupar las por muestras. Se eliminó los reads erróneos con (DADA2). Se visualizó los archivos de la tabla de frecuencias y las secuencias representativas y se obtuvo los OTUs.

2.2.3.6 Análisis de diversidad Alfa y Beta

Para el análisis de diversidad alfa (diversidad dentro de muestras) y beta (diversidad entre muestras). Lo primero que se realizó es la construcción de un árbol filogenético usando q2-phylogeny y align-to-tree-mafft-fasttree, y se obtuvo un árbol sin raíz usando FastTree lo que permitió remover secuencias altamente variables.

Luego, se usó el complemento q2-diversity y el método core-metrics-phylogenetic para calcular la diversidad alfa (índice de diversidad de Shannon, diversidad filogenética y uniformidad de Faith) y las métricas de diversidad beta (distancia Bray-Curtis, distancia UniFrac no ponderada, distancia UniFrac ponderada), también se realizó el análisis de coordenadas principales (PCoA). En resumen, en este paso se aplicó un plugin que determino varias métricas de diversidad alfa y beta, generando gráficas de exploración PCoA con distancias taxonómicas y filogenéticas, y poniendo a prueba asociaciones entre categorías declaradas en el archivo de metadatos. Se generó un archivo de visualización del weighted unifrac, que mostró los datos de la distancia UniFrac.

2.2.3.7 Análisis de Alfa rarefacción

Se realizó un análisis de alfa rarefacción para evaluar la diversidad alfa. En este paso se construyó curvas de rarefacción de tres distintas métricas de diversidad alfa: riqueza observada, diversidad taxonómica y diversidad filogenética.

2.2.3.8 Análisis taxonómico

Para la clasificación taxonómica se utilizó la base de datos de Greengenes para ello se utilizó secuencias Feature-table y res-seqs (3000) y el comando alineado-rep-seqs para alinear el árbol y eliminar variables que provocan ruido. En este paso se asignó una identificación taxonómica, con estos datos y las tablas de frecuencia se generó los perfiles taxonómicos de los OTUs que se van a analizar.

2.2.3.9 Análisis de abundancia diferencial

Para las pruebas de abundancia diferencial entre grupos, se utilizó el Análisis de composición de microbiomas (ANCOM), luego se utilizó la composición q2 y el complemento add-pseudocount. para que la frecuencia mínima comience desde 1 y no desde 0. Se utilizó el complemento q2-gneis para encontrar diferencias en la secuenciación de profundidad en base a proporciones y obtener mapas de calor para medir la abundancia relativa. Para ello se utilizó taxa-bar-plots para poder visualizar el conteo de cada nivel taxonómico que puede llegar al nivel de especie. El conteo para cada OTU proviene de la suma de cada taxón.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Obtención de parámetros físico químicos

En primera instancia, se llevó a cabo la selección de los tres puntos estratégicos de muestreo de agua en cada una de las granjas según su infraestructura y siguiendo el protocolo establecido por la norma INEN 1108. Para las granjas San José (Anexo 1) y Las Orquídeas (Anexo 2) las muestras fueron tomadas en las siguientes ubicaciones: pozo, planta de tratamiento de agua secundaria y niple. Estos puntos fueron seleccionados con la finalidad de evaluar la calidad del agua de las granjas antes durante y después del tratamiento de las aguas de consumo de las aves. Es importante mencionar que el tipo de agua analizado proviene de pozos.

Tabla 7. Resultados de los análisis fisicoquímicos del agua en las diferentes granjas.

Parámetros	Unidades	Granja San José	Granja Las Orquídeas	Nivel máximo aceptable
pH	-	7.87 ± 0.10	7.66 ± 0.08	6.0 – 8.0
Cobre	mg/L	0.19 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.6
Dureza total	ppm	40.00 ± 0.0	115.00 ± 0.0	110
Hierro	mg/L	0.22 ± 0.0	0.16 ± 0.0	0.3
Nitratos	mg/L	5.80 ± 0.0	0.2 ± 0.0	25
Zinc	mg/L	0.00 ± 0.0	0.05 ± 0.0	1.5
Cloro libre	mg/L	4.10 ± 0.0	0.01 ± 0.0	250
Calcio	mg/L	16.00 ± 1.7	46.3 ± 0.6	60
Magnesio	mg/L	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	125
Sulfatos	mg/L	10.00 ± 0.0	2.00 ± 0.0	250
Plomo	mg/L	0.002 ± 0.0	0.003 ± 0.0	0.02

Nota. Todos los análisis de parámetros fisicoquímicos se realizaron por triplicado

Fuente: (Cobb Vantress, 2022)

3.1.1.1 pH

El pH indica la concentración de iones de hidrógeno en una disolución (**Mustedanagic et al., 2023**). Según **Guo et al. (2023)**, las bacterias presentes de forma natural en el intestino de las aves varían dependiendo el segmento del TGI en el que se encuentren. Estas bacterias presentan diferentes factores de crecimiento que pueden verse afectados por el pH del agua que ingiera el pollo (**Ricke & Rothrock, 2020**).

Osei et al. (2019), mencionan que cuando los valores de pH son bajos (ácidos), pueden altera los procesos digestivos, disminuyendo la absorción de nutrientes (**Mishra et al., 2023**). Por otra parte, el pH elevado (alcalinos) causa: cambios en la composición de la microbiota. En la investigación realizada por **Saleh et al. (2023)**, menciona que los microorganismos presentes en el intestino habitan en un pH ácido y presentan sensibilidad a los cambios de pH, por lo que al entrar en contacto con aguas alcalinas se genera una disbiosis en la microbiota lo que facilita la colonización de bacterias patógenas, retrasando el rendimiento del ave.

Los resultados obtenidos de este análisis indican que la granja San José presenta un valor de pH de 7,86 mientras que, la granja Las Orquídeas presenta un valor de 7,66 por lo que, los valores de pH se encuentran dentro del rango máximo permisible según las normas establecidas por el Manual de Manejo de Pollos Cobb 500 y las normas INEN 1108.

3.1.1.2 Cobre (Cu)

El cobre es un metal que presenta una alta conductividad eléctrica y térmica, se lo puede encontrar en altas concentraciones cuando proviene de aguas subterráneas (**Skalny et al., 2021**). Varios estudios han demostrado que el cobre altera el metabolismo energético y proteico, así como la biosíntesis de aminoácidos relacionados con la modulación de la microbiota intestinal (**Pontin et al., 2021**). Este metal regula la abundancia y diversidad bacteriana en el intestino, reduciendo bacterias patógenas (**Zhang et al., 2017**). La acumulación intracelular del cobre altera las

proteínas y genera lesiones celulares en las bacterias patógenas, mejorando la funcionalidad intestinal **(Dalecki et al., 2017)**.

En la Tabla 9 se detallan los valores de cobre presentes en el agua. En las dos grajas se obtuvo valores de 0.19 mg/L y 0.00 mg/L respectivamente; por lo cual se encuentran dentro del límite permitido que es 0.6 mg/L. De acuerdo con **Bortoluzzi et al. (2020)**, en el caso que las aves ingieran agua con altos niveles de Cu puede ejercer cambios en la microbiota intestinal y los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de las bacterias patógenas. Además, genera toxicidad ocasionando efectos laxantes y a su vez modificar el sabor del agua, lo que conlleva como consecuencia la disminución del consumo de agua diario de las aves afectando su correcto desarrollo **(Zhang et al., 2019)**.

3.1.1.3 Dureza total

La dureza del agua es una medida que hace referencia a la concentración de sales de calcio y magnesio disueltas en el agua **(Büker et al., 2021)**. Según **Saleh et al. (2023)**, este parámetro no es perjudicial para la salud de las aves, pero es importante llevar un control de la dureza del agua.

Los resultados obtenidos del análisis de este parámetro para la granja San José se encuentran dentro del límite permisibles con un valor de 40.00 ppm. La granja Las Orquídeas presentó un valor de dureza de 115.00 ppm sobrepasando el límite permisibles establecido que es de 110 ppm. La variación de la dureza del agua en las granjas de acuerdo con **Hassan (2019)**, se debe a la elevada cantidad de iones calcio y magnesio disueltos, presentando una mayor mineralización del agua.

Otro de los factores que influye para valores altos de dureza del agua es la ubicación geográfica de la toma principal que será distribuida a las aves **(Sari et al., 2022)**. En el caso de ambas granjas la toma principal de agua es de pozos, sin embargo, la granja Las Orquídeas se encuentra ubicada cerca de un yacimiento minero. El agua subterránea entra en contacto con objetos naturales como rocas y otros elementos; esto ocasiona el incremento de minerales en el agua **(Jagaba et al., 2020)**.

3.1.1.4 Hierro (Fe)

El hierro es un metal maleable que se encuentra presente en las aguas subterráneas, la mayoría de las bacterias que habitan en el intestino requieren de este para crecer y desarrollarse de manera adecuada (Vergnes et al., 2017). Los estudios del efecto del hierro en la microbiota son limitados y se centran en especies bacterianas individuales (Shannon & Hill, 2019). De acuerdo con Knight et al. (2019), menciona que la presencia de hierro altera la microbiota intestinal al influir en la manera en que los microorganismos adquieren energía de los nutrientes consumidos por el organismo huésped.

El autor Di Martino et al. (2018), menciona que las altas concentraciones de Fe alteran el sabor y olor del agua, provocando una reducción de la ingesta de agua. Cuando el ave disminuye el consumo de agua, el potencial energético decrece, por ende, no llega a obtener el peso esperado, en un tiempo determinado (Cai et al., 2017). Los resultados del análisis realizado reflejan que los niveles de Fe de ambas granjas se encuentran dentro del rango permisible que es de 0.3 mg/L, presentando un valor de 0.22 mg/L y 0.66 mg/L respectivamente, por lo tanto, las aves que consumen el agua están libres de los efectos adversos antes mencionados. En una investigación realizada. Bortoluzzi et al. (2020), se ha demostrado que los niveles bajos de hierro favorecen una mejor función intestinal y la disminución de la incidencia de efectos laxantes, lo que resulta en un mayor crecimiento y rendimiento de los pollos de engorde.

3.1.1.5 Nitratos (NO³⁻)

Los nitratos se forman naturalmente en la fase final de la descomposición de la materia orgánica (Augusto et al., 2022). Su presencia en el agua es indicativa de contaminación, causada por residuos de origen antropogénico o a su vez por aguas de escorrentía con presencia de fertilizantes nitrogenados (Saleh et al., 2023).

Cuando los nitratos se encuentran en niveles elevados, reduce la capacidad de los glóbulos rojos para transportar el oxígeno en el torrente sanguíneo (Sinha et al., 2021). En un estudio realizado por Ma et al. (2023), menciona que la comunidad microbiana

intestinal cambia frente a la exposición elevada de nitratos y podría alterar la diversidad α y β , específicamente la proporción de flora intrínseca puede disminuir, mientras que la de los microorganismos potencialmente patógenos aumentan.

En el estudio realizado los niveles de nitratos encontrados en el agua de las granjas San José y Las Orquídeas fueron de 5.80 mg/L y 0.2 mg/L, respectivamente. De acuerdo con lo reportado en la Tabla 9, los niveles de nitratos cumplen con los requisitos de la normativa INEN 1108 y el Manual de manejo de pollos Cobb 500 para agua potable de consumo animal.

3.1.1.6 Zinc (Zn)

El zinc es un oligoelemento de gran importancia tanto para el ser humanos como para los animales, en el caso de los pollos este ayuda en la regeneración de tejidos celulares, el crecimiento y el desarrollo ósea (Skalny et al., 2021). Por el contrario De Grande et al. (2020), menciona que en concentraciones elevadas llega a ser tóxico y puede generar complicaciones en el TGI debido a que no se absorbe de manera adecuada y no son almacenadas en el organismo, por el contrario, este llega a ser expulsado por medio de la orina o las heces. Los resultados obtenidos de Zn para la granja San José fue de 0.00 mg/L mientras que para la granja Las Orquídea se obtuvo un valor de 0.05 mg/L indicando que los valores están dentro del límite permisible (1.5 mg/L).

En concentraciones adecuadas el Zn ayuda a mejorar la incidencia de diarreas, esto se debe a que se reduce el daño intestinal ayudando a mantener la integridad de la mucosa mediante la modulación de la microbiota intestinal (Kociova et al., 2020). De acuerdo con Velasco et al. (2018), el Zn ayuda a inhibir la presencia de *E. coli* patógena al controlar la expresión de la alfa-hemolisina (exotoxina producida por *E. coli*).

3.1.1.7 Cloro libre

La cloración del agua es necesario debido a que ayuda a eliminar los posibles microorganismos patógenos presentes y de esta manera poder evitar enfermedades en las aves (Kafle, 2020). De acuerdo con Zou et al. (2023), la presencia de cloro en el

agua potable para pollos de engorde no produce daños en la mucosa intestinal, por el contrario, se ha evidenciado que ayuda a reducir microorganismos como *E. coli* y *Enterococcus* spp. tanto en el buche como en el ciego de los pollos.

En la granja San José se obtuvo una concentración de 4.10 mg/L, mientras que para la granja Las Orquídeas la concentración fue de 0.01 mg/L. En la granja San José se obtuvo una mayor concentración de cloro libre esto se puede deber a que la cloración del agua había sido realizada antes de la toma de muestra, mientras que en la granja Las Orquídeas las cloración aún no se realizaba. Sin embargo, ambos valores se encontraron dentro del límite aceptado (250 mg/L).

3.1.1.8 Calcio (Ca)

El calcio al igual que el Mg es responsable de la dureza y el mal sabor en al agua (Kafle, 2020). En la granja Las Orquídeas se obtuvo concentración de 16 mg/L menor al de la granja San José 46.3 mg/L, pero ambas se encuentran dentro de los límites aceptados (60 mg/L). De acuerdo con Xing et al. (2020), el calcio no causa problemas en la salud de las aves debido a que estas pueden tolerar hasta 400 mg/L de Ca.

3.1.1.9 Magnesio (Mg)

El magnesio es uno de los principales metales alcalinotérreos causantes de la dureza del agua el cual puede llegar a modificar el sabor (amargo) (Kafle, 2020). De acuerdo con Del Chierico et al. (2021), en concentraciones adecuadas el Mg ayuda a restaurar la función de la mucosa intestinal. En ambas granjas no se encontró la presencia de magnesio se obtuvo una concentración de 0.00 mg/L.

Se puede mencionar que si los valores obtenidos son mayores a los establecidos no es perjudicial para el ave debido a que rara vez ocasiona problemas en la salud. Sin embargo, Saleh et al. (2023), señala que cuando este se combina con el ion sulfato y forma sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ocasiona fuertes diarreas e irritaciones intestinales en los animales provocando retrasos en el desarrollo.

3.1.1.10 Sulfatos (SO₄²⁻)

Los sulfatos se pueden encontrar de manera natural o artificial debido a la presencia de industrias (Kafle, 2020). En las granjas San José y Las Orquídeas los valores obtenidos se encontraron dentro del nivel máximo aceptable (250 mg/L) con una concentración de 10 mg/L y 2 mg/L respectivamente. Sin embargo, Ebrahimi et al. (2023), menciona que cuando estos valores sobrepasan el valor permisible este tipo de aguas no es bien tolerada por las aves debido a que son los principales causantes de un efecto laxante y retrasos en el crecimiento. Además, si presentan mal olor significa que se tiene una alta concentración de hidrógeno el cual se produce como subproducto de bacterias reductoras de sulfato (Saleh et al., 2023).

3.1.1.11 Plomo (Pb)

La contaminación del plomo se da debido al empleo de pesticidas y actividades industriales las cuales contaminan el suelo y las aguas subterráneas (Kafle, 2020). Los resultados obtenidos mostraron que el nivel de plomo para las dos granjas se encuentra dentro del límite permitido (0.02 mg/L) con concentraciones de 0.003 mg/L y 0.002 mg/L respectivamente por lo que los pollos no están expuestos a este tipo de contaminación. Según Naili et al. (2021), señala que la bioacumulación de Pb se da principalmente en riñones, hígado y pulmones cambiando la estructura microscópica de sus tejidos, teniendo un impacto negativo en la actividad enzimática. Por su parte, Ebrahimi et al. (2023), añade que la intoxicación por plomo también puede llegar a reducir el número de anticuerpos y su vez puede desequilibrar la microbiota intestinal de las aves.

3.1.2 Obtención de parámetros microbiológicos

Tabla 8. Análisis microbiológicos del agua en las diferentes granjas.

Bacterias	Granja San José (UFC/mL)	Granja Las Orquídeas (UFC/mL)	Nivel máximo aceptable (UFC/mL)
<i>E. coli</i>	0	2	<100
Bacterias coliformes	0	0	<50

Fuente: (Cobb Vantress, 2022)

3.1.2.1 *E. coli*

E. coli es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo su presencia en el agua es un indicativo de contaminación fecal, las aves inmunodeprimidas son susceptibles a contraer la bacteria (Wang et al., 2021). Esta bacteria se encuentra presente en el TGI de aves, siendo fácilmente diseminada al ambiente por medio de las heces (Yousef et al., 2023). En un estudio realizado por da Rosa et al. (2020), menciona que el contagio de esta bacteria a través del agua puede causar colibacilosis en las aves, generando lesiones fibrosas alrededor de diferentes viseras y problemas respiratorios.

En la investigación ejecutada se evidenció que en la granja San José no existe presencia de *E. coli* en el agua, mientras que, en la granja Las Orquídeas se encontró 2 UFC/mL que se encuentra dentro del límite permisible menor a 100 UFC/mL establecido de acuerdo con normativa NTE INEN 1108 y el Manual de Manejo de Pollos Cobb 500. La presencia o ausencia de la bacteria depende del tratamiento previo que haya tenido al agua y que no exista una fuente de contaminación en la red de distribución (Wei et al., 2023).

3.1.2.2 Bacterias coliformes

Las bacterias coliformes indican la presencia de contaminación fecal en el agua. En ambas granjas no se encontró la presencia de este tipo de bacterias (0 UFC/mL). Swelum et al. (2021), menciona que la principal causa de contaminación es la

presencia de haces. Por su parte **Fancher et al. (2020)**, indica que la mayoría de estas bacterias presentes en el agua son inofensivas, pero si hay bacterias que pueden causar enfermedades en las aves como malestar en el TGI y diarrea.

3.1.3 Análisis Metagenómico

El análisis metagenómico efectuado involucró la secuenciación del amplicon 16S. El motivo por el cual el estudio se sesgó únicamente en la amplificación del gen 16S rRNA fue debido a que según **Johnson et al. (2019)**, menciona que 90 % de la composición de la microbiota se encuentra formada por bacterias y únicamente el 10 % por arqueas y hongos. En base a lo antes mencionado la secuenciación de amplicon del gen 16S rRNA, permitió establecer las relaciones filogénicas, la taxonomía y la abundancia de especies bacterianas incluidas ciertas familias de arqueas. Las muestras fecales de los pollos de engorde empleadas para este estudio fueron tomadas de dos granjas San José y Las Orquídeas ubicadas en la parroquia Madre Tierra, (Anexo 3 y Anexo 5). Es importante mencionar que los pollos de engorde se encontraban bajo los mismos parámetros es decir que se les administraba el mismo tipo de alimento, agua, clima y ubicación geográfica.

3.1.3.1 Diversidad Alfa

Tabla 9. *Resultado de diversidad de especies.*

Número de muestra	Identificación	Diversidad de especies de Shannon	Número de especies identificadas
1	M1G1	2.886	836
2	M2G1	2.650	896
3	M3G1	2.428	851
4	M4G1	2.648	1072
5	M1G2	1.977	846
6	M2G2	3.378	973
7	M3G2	2.130	830
8	M4G2	2.744	1080

Nota: La diversidad de especies de Shannon mide la entropía de las clasificaciones a nivel de especie en la muestra. En la codificación presentada para la identificación M corresponde al número de muestreo, G1 representa a la granja ‘San José’, mientras que G2 representa a la granja ‘Las Orquídeas’.

Para cuantificar la biodiversidad específica de las muestras se empleó el índice de diversidad de Shannon (**Kang et al., 2021**). El índice sirve para identificar la heterogeneidad de una comunidad en base a dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa (**Mandal et al., 2020**). Se la puede describir como una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad (**Pandit et al., 2018**). De acuerdo con **Sundar Paul et al. (2020)**, el índice de Shannon oscila en un rango de 1 a 5, los valores menores a 2 se los interpreta como diversidad baja, de 2 a 3.5 presencia de una diversidad media y los valores superiores a 3.5 como diversidad alta.

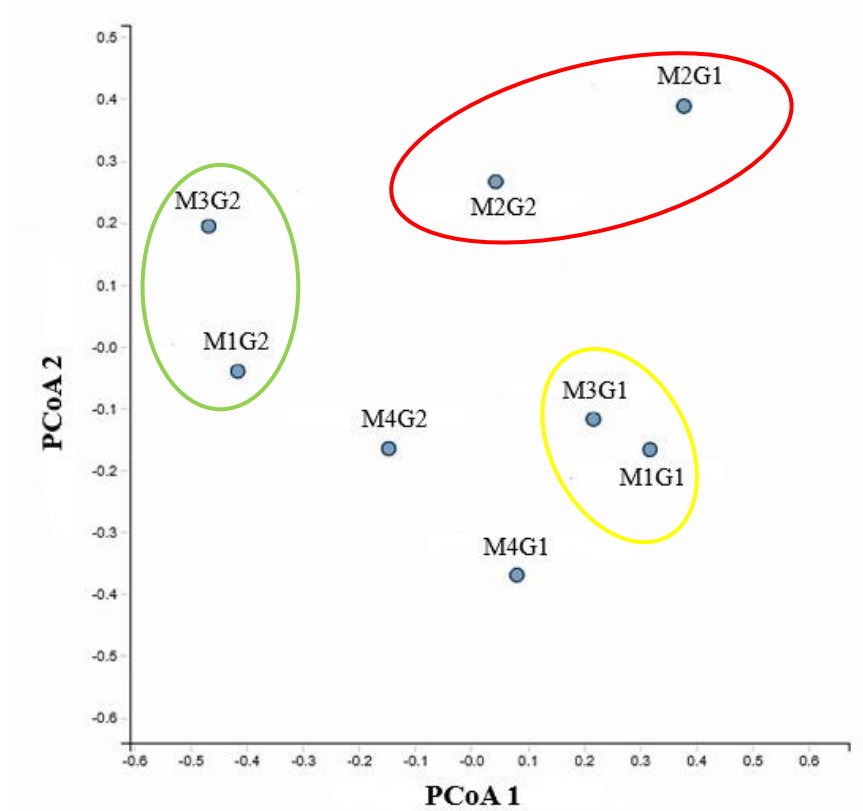
Según los resultados de los análisis obtenidos (Tabla 9) se refleja que el valor del índice de Shannon de todas las muestras, con excepción de la muestra 5, presentan una biodiversidad específica alta. En el caso de la muestra 5 al tener un valor menor a dos presenta una diversidad baja. En una investigación realizada **Qi et al. (2019)**, menciona que la variabilidad de este índice incrementa con la riqueza del ecosistema, es decir con el número de especies y disminuye cuando la mayoría de los individuos pertenecen a una misma especie.

En base a los conceptos antes mencionados, se puede interpretar que la muestra que presenta mayor diversidad es la número 6 con un total de 973 especies identificadas y un índice de 3.378. Es fundamental destacar que la presencia de un valor por debajo del estándar en el índice no indica una falta de diversidad microbiana en la muestra. Más bien, sugiere que la mayoría de los microorganismos presentes pertenecen a una misma especie, como lo es en el caso de la muestra 5.

3.1.3.2 Diversidad Beta

Figura 4.

Análisis de coordenadas principales (PCoA)

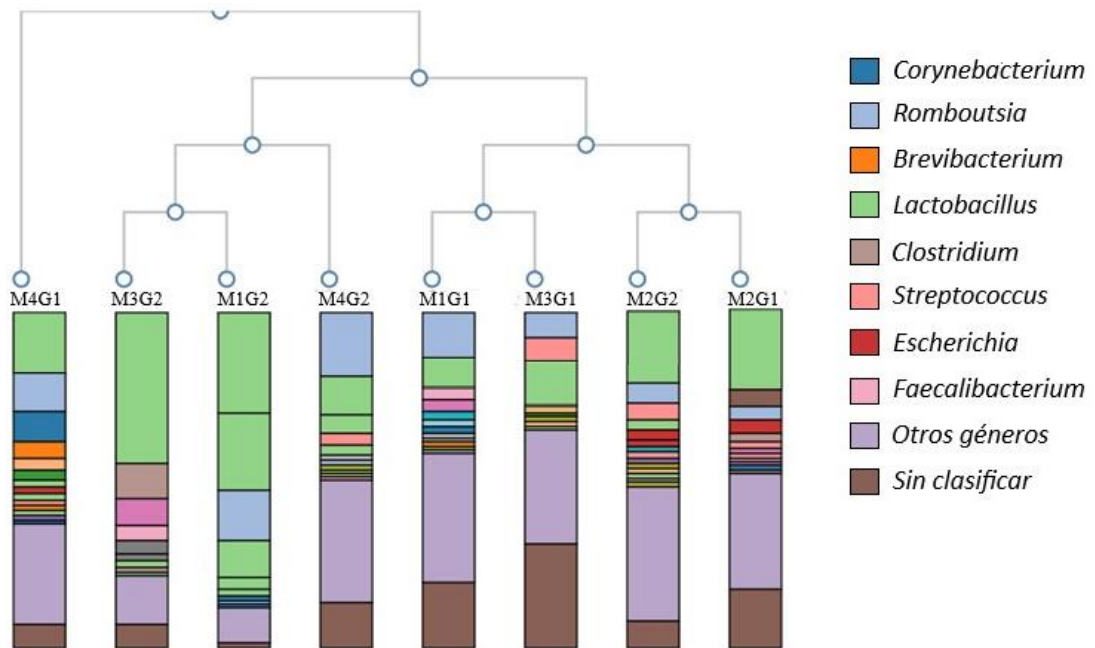


Nota: Este diagrama de dispersión muestra un análisis de coordenadas principales (PCoA) de la abundancia relativa normalizada de todas las muestras.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) mide las diferencias en la distribución de clasificaciones taxonómicas entre muestras, hasta un nivel taxonómico fijo. El (PCoA), también conocido como escalamiento multidimensional métrico, detalla y mide el grado de similitud de la composición de la comunidad microbiana entre las muestras, con base a una matriz euclidiana entre objetos (**Wang et al., 2022**). Según **Shi et al. (2020)**, menciona que mientras más cercanas se encuentra una muestra de otra son más similares. En el gráfico de PCoA (Figura 3) se puede observar que M1G1 con M3G1, M3G2 con M1G2 y M2G1 con M2G2 son las muestras que presentan mayor similitud debido a que la distancia entre ambas es menor en comparación con M4G2 y M4G1.

Figura 5.

Dendrograma de agrupamiento jerárquico.



Nota: Este dendrograma muestra una agrupación jerárquica de muestras basada en clasificaciones a nivel de género. El gráfico de barras debajo de cada muestra presenta la abundancia relativa de sus clasificaciones a nivel de género.

La mayoría de los métodos de agrupamiento dependen de la similitud que exista entre los OTUS (Unidades Taxonómicas Operaciones) de una comunidad en este caso de una muestra biológica con otra y que estos presenten un comportamiento homogéneo (Kumar Awasthi et al., 2020). De acuerdo con Milanese et al. (2019), la abundancia relativa se la puede representar gráficamente en árboles filogenéticos, haciendo referencia al porcentaje que representan los microorganismos de una especie particular respecto al total de microorganismos presentes en una muestra.

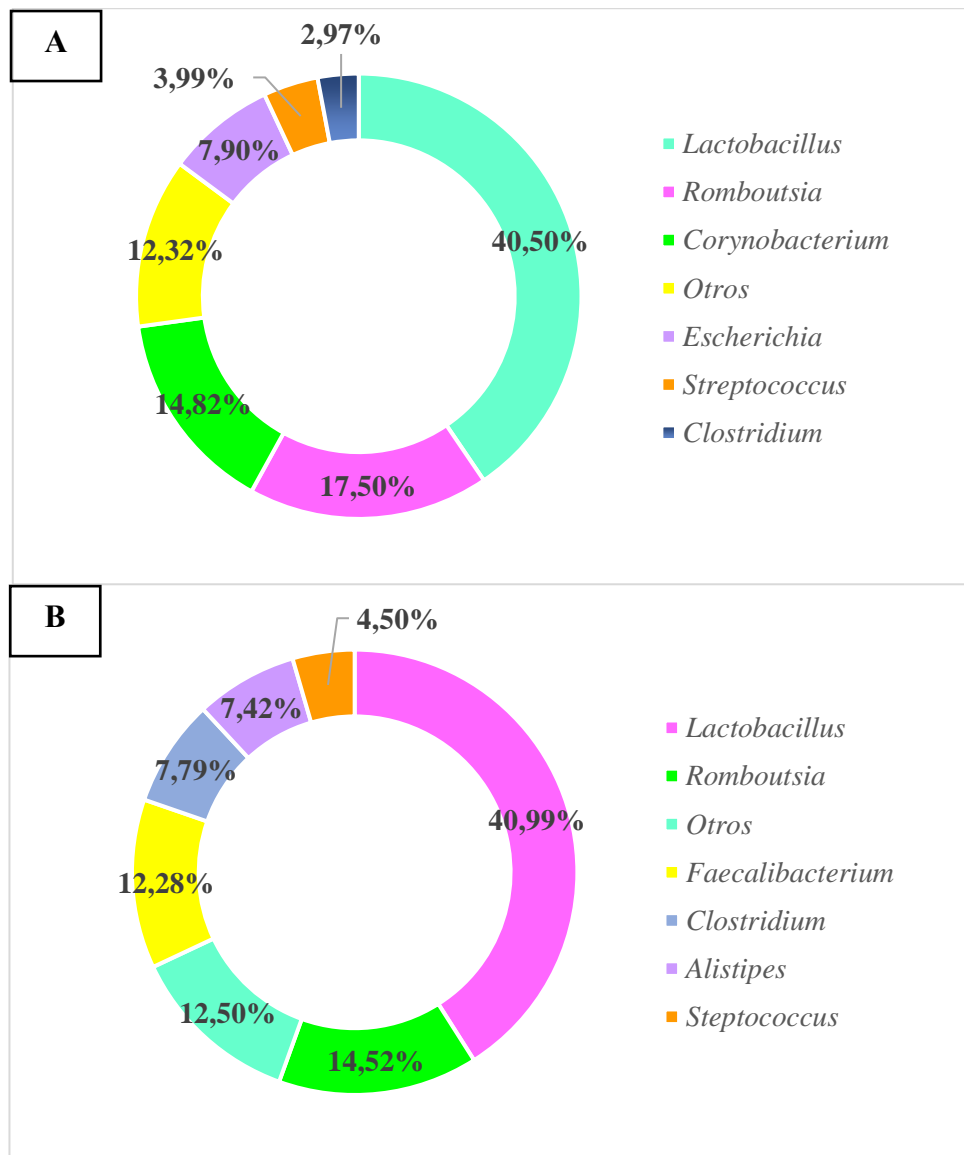
Al realizar el análisis de diversidad Beta se observaron diferencias significativas entre cada una de las muestras analizadas debido a la formación de clusters (Figura 4) indicando que hay diferentes comunidades bacterianas entre cada muestras. Kumar Awasthi et al. (2020), señala que el clustering jerárquico hace agrupamientos por etapas empleando el método de distancia mínima, media o máxima. En la figura 3B se

puede observar que la muestra que presenta una mayor diferencia al resto es la muestra M4G1 y las que presentan una mayor similitud son las muestras M1G1 con M3G1.

3.1.3.3 Análisis taxonómico a nivel de genero

Figura 6.

Análisis taxonómico a nivel de género.



Nota: El análisis taxonómico muestra las asignaciones taxonómicas de las comunidades microbianas presentes en la microbiota fecal de los pollos de engorde de A) Granja San José y B) Graja Las Orquídeas.

El análisis taxonómico (Figura 6A y 6B) reveló que en las granjas San José y Las Orquídeas el género bacteriano dominante fue *Lactobacillus* (40.50 % y 40.99 % respectivamente) seguida por el género *Romboutsia* (17.50 % y 14.52 % respectivamente). De acuerdo **Shokryazdan et al. (2017)**, menciona que los *Lactobacillus* se establecen en el intestino de los pollos un día después de la eclosión, presentan una alta capacidad para adherirse al epitelio intestinal, por lo que es considerada parte de la flora bacteria normal del TGI. Por otro lado, **Gerritsen et al. (2017)**, menciona que *Romboutsia* está presente en el intestino delgado y tiene la capacidad de fermentar glucosa y otros carbohidratos simples.

Entre los géneros bacterianos potencialmente patógenos para ambas granjas se encontró *Streptococcus* (3.99 % y 4.50 % respectivamente), estos son parte de la microbiota normal de los pollos, la mayor parte de especies pertenecientes a este género son considerados patógenos oportunistas ubicados en la mucosa del TGI de las aves (**Vitetta et al., 2019**). *Clostridium* (2.97 % y 7.79 % respectivamente), **Grond et al. (2018)** menciona que son bacterias quimioorganotróficas que tienen la capacidad de fermentar nutrientes (carbohidratos, proteínas y ácidos orgánicos) y producir ácido grasos de cadena corta, mismos que aportan beneficios a la salud intestinal contribuyendo al mantenimiento de la función barrera intestinal. Sin embargo, **Yan et al. (2022)**, menciona que ciertas especies como *Clostridium perfringens* pueden causar enteritis necrótica afectando el TGI de las aves.

Los géneros bacterianos identificados que presentaron un menor porcentaje en la granja San José fueron *Corynebacterium* (14.82 %) y *Escherichia* (7.90 %). De acuerdo con **Jurburg et al. (2019)**, *Escherichia* es considerada como un patógeno, este se encuentra en mayor cantidad en las heces que en los ciegos de los pollos de engorde. Asu vez, **Zhou et al. (2021)**, agrega que esta bacteria presenta una correlación negativa al crecimiento y la digestibilidad de la grasa de los pollos.

En comparación con la anterior granja, Las Orquídeas presentó diferentes géneros bacterianos con porcentajes bajos, entre los cuales se encuentra *Faecalibacterium* (12.28 %) que según **Souffriau et al. (2020)**, es una bacteria del colon productora de butirato, este juega un papel importante en la fisiología intestinal debido a que posee

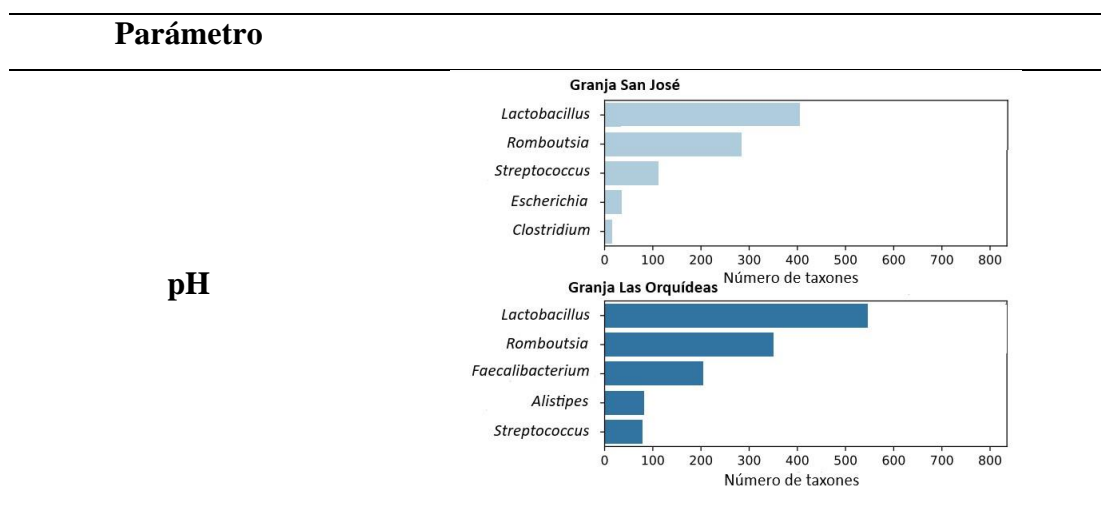
la capacidad de reducir la inflamación de la mucosa intestinal. Seguida por *Alistipes* (7.42 %) que acuerdo con **Biasato et al. (2019)**, las bacterias pertenecientes a este género son organismos resistentes a la bilis con la capacidad de producir fibrinolisisina, digerir gelatina y fermentar carbohidratos para producir ácido acético, por lo que se consideran bacterias benéficas en la microbiota intestinal.

La composición taxonómica que no presenta género se debe a que no se ha registrado información de las bacterias identificadas en la base de datos (SILVA) con la que se comparó los resultados. Además, se puede mencionar que el análisis taxonómico de ambas granjas registra una similitud en la composición bacteriana de la microbiota fecal de los pollos.

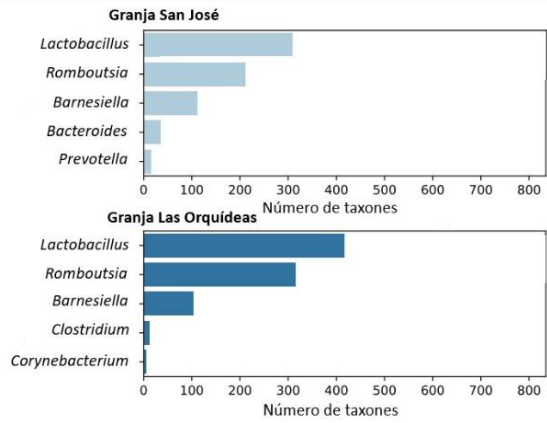
3.1.3.4 Análisis de Abundancia relativa

La abundancia es el número de taxones que compone cada una de las diversas comunidades bacterianas. Proporción de un taxon respecto a todo a toda la comunidad presente en un sitio (**Osuna-Prieto et al., 2023**).

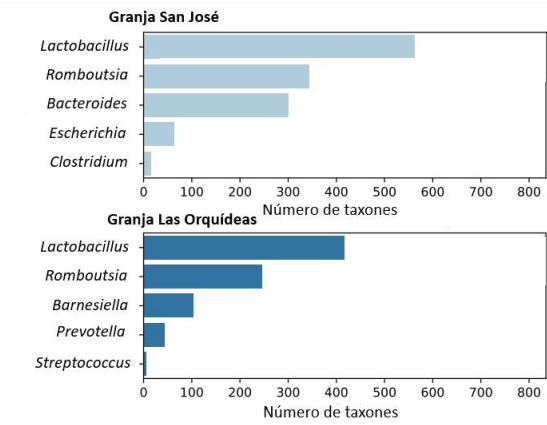
Tabla 10. Análisis de abundancia frente a los parámetros fisicoquímicos del agua.



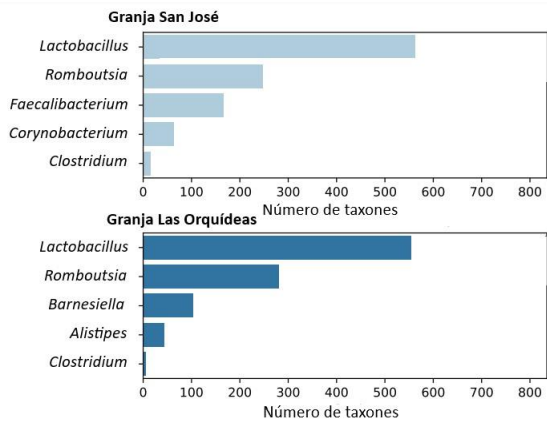
Cobre



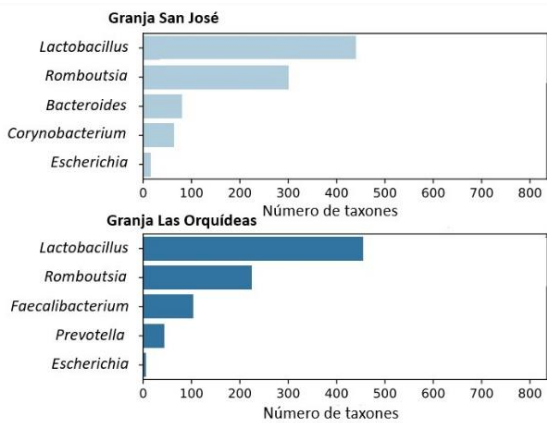
Dureza total



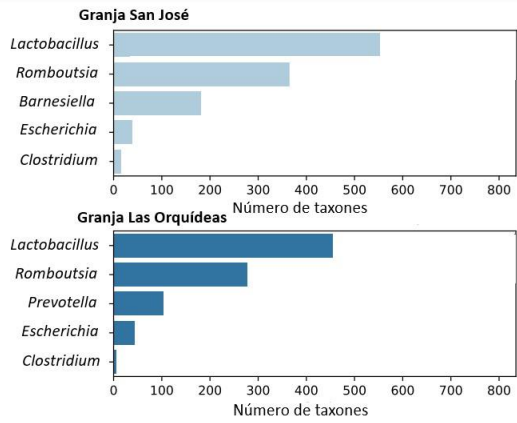
Hierro



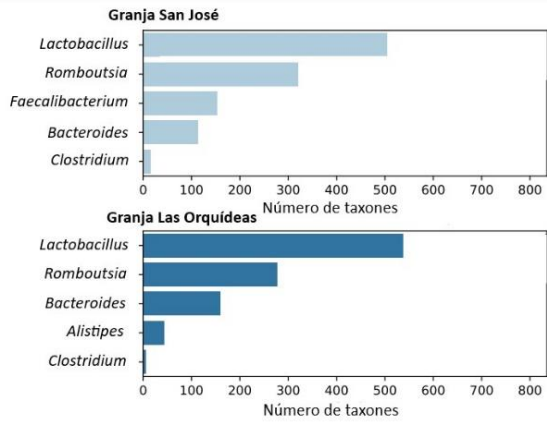
Nitratos



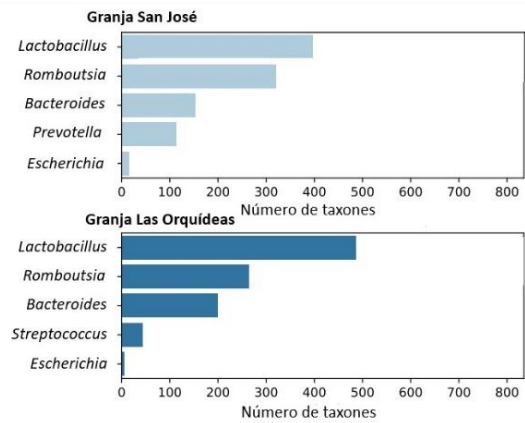
Zinc



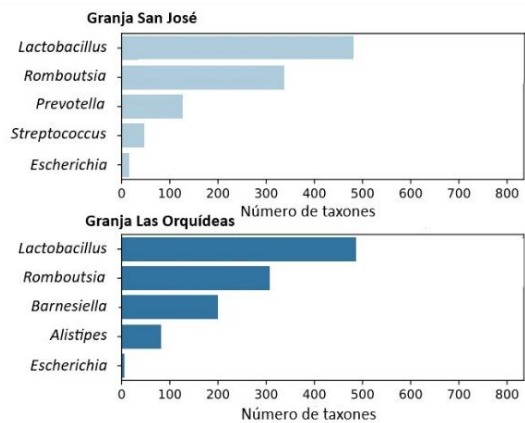
Cloro libre



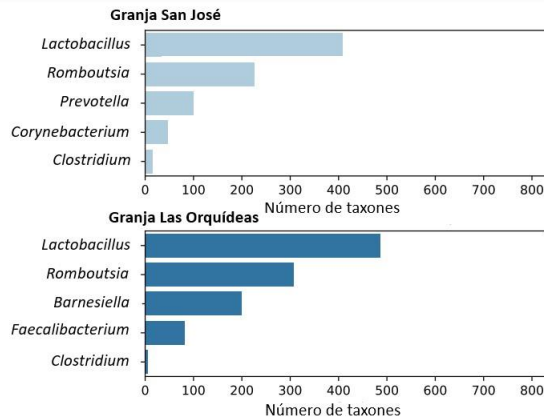
Calcio



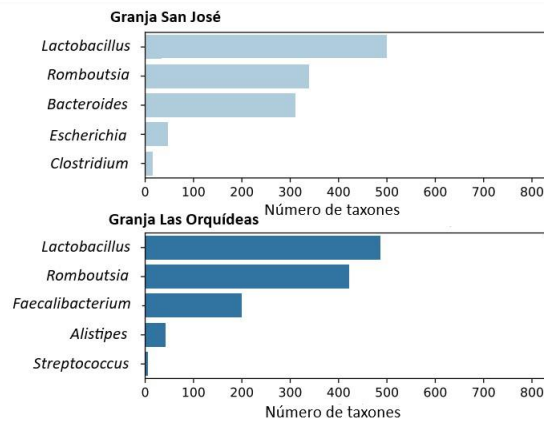
Magnesio



Sulfatos



Plomo



Los resultados de los análisis realizados (Tabla 10) determinaron que la composición taxonómica de las muestras presentó una mínima variación en los taxones de las comunidades bacterianas más abundantes de la microbiota fecal de los pollos de ambas granjas, pese al ser evaluados frente a los parámetros de calidad de agua, tomando en cuenta que los mismo se encuentran dentro de los parámetros de calidad de agua (Tabla 7). Los géneros bacterianos dominantes y con mayor número de taxones en todos análisis corresponden a *Lactobacillus* y *Romboutsia*. Sin embargo, se evidenció la variación de bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Barnesiella* dentro de las comunidades bacterianas.

Se puede evidenciar que el agua que consumen los pollos en las dos granjas no altera significativamente la microbiota intestinal. En un estudio realizado por **Vanhaecke et al. (2022)**, menciona que en estudios en la microbiota de humanos se ha demostrado que el tipo de agua de consumo es un factor que contribuyen a la variación de la microbiota intestinal. Por lo tanto, este factor también podría llegar a afectar la microbiota de los pollos de engorde. Sin embargo, se demostró que la calidad de agua

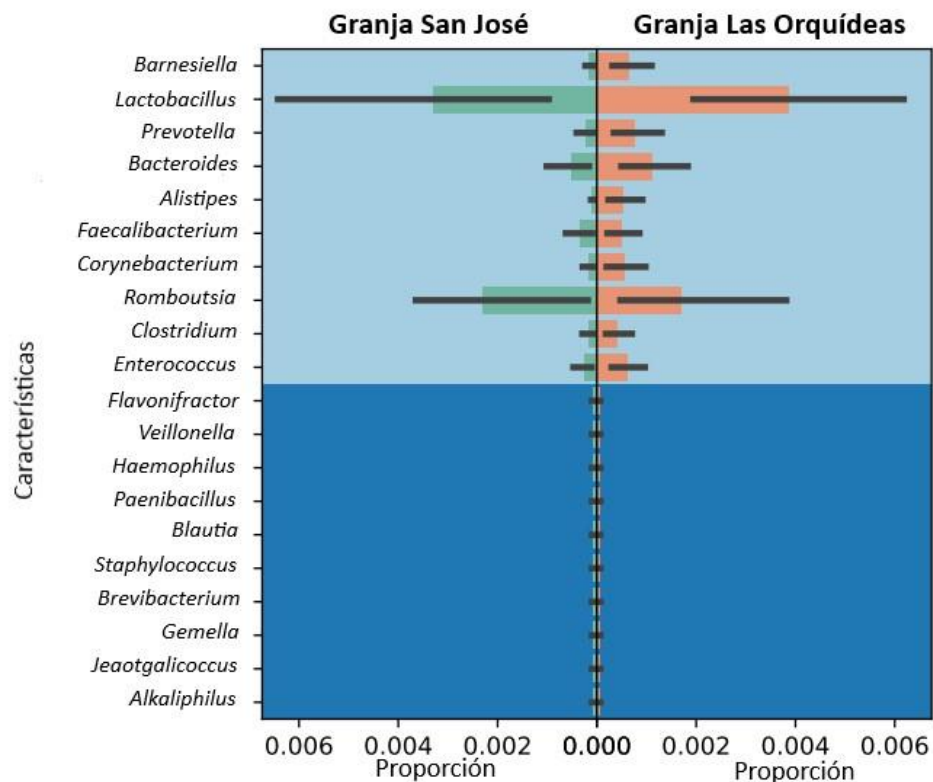
de ambas granjas no alteró significativamente la composición taxonómica microbiana intestinal, esto se debe a que el agua analizada se encontró dentro de los parámetros establecidos y las fuentes de recolección fueron similares provenientes las dos de pozos.

3.1.3.5 Abundancia diferencial

El análisis de abundancia diferencial (DDA) tiene como función principal identificar características (OTU, ASV, taxones, especies) que son diferencialmente abundantes entre comunidades bacterianas (Nearing et al., 2022).

Figura 7

Gráfico de proporción de Gneiss de abundancia diferencial entre las granjas San José y Las Orquídeas.



Se realizó una comparación de la microbiota entre las granjas San José y Las Orquídeas mediante la abundancia relativa utilizando Gneiss. En la Figura 7 se observó el predominio de los géneros de *Lactobacillus* y *Romboutsia* para ambas granjas,

mientras que las bacterias menos abundantes fueron las pertenecientes a los géneros *Flavinofractor*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Paenibacillus*, *Blautia*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Alkaliphilus*.

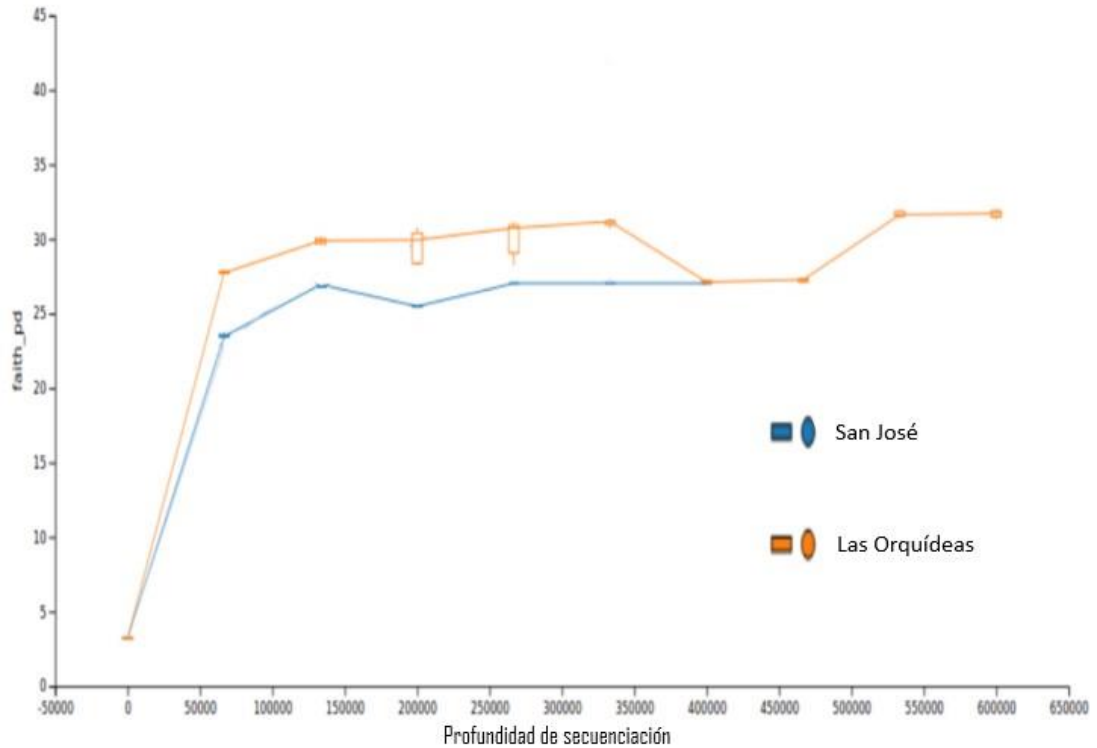
De acuerdo con **Memon et al. (2022)**, *Lactobacillus* es un género comensal importante en el tracto gastrointestinal del pollo, proporciona efectos beneficiosos sobre la salud y el rendimiento al producir sustancias antimicrobianas, ácidos grasos de cadena corta, exopolisacáridos y fuentes adicionales de energía. Una disminución representativa de este microorganismo en la microbiota genera una alteración en el TGI ocasionando que este se encuentre vulnerable frente a la infección de patógenos oportunistas (**Juricova et al., 2022**).

Según **Shokryazdan et al. (2017)**, *Romboutsia sp.* está relacionado con actividades metabólicas intestinales que dan como resultado la producción de una amplia gama de compuestos esenciales como los productos finales de la fermentación bacteriana, suelen ser absorbidos fácilmente por el huésped y metabolizados como fuentes de energía. De igual manera una abundante disminución de este microorganismo altera las funciones metabólicas intestinales, facilitando la colonización de patógenos oportunistas (**Bindari & Gerber, 2022**).

3.1.3.6 Alfa rarefacción

Figura 8.

Análisis de alfa rarefacción entre las dos granjas.



Para evaluar la riqueza de especies a partir de los resultados del muestreo se empleó la alfa rarefacción. Esta técnica se aplica a menudo al análisis de unidades taxonómicas operativas (OTU), y se utiliza para comparar índices de diversidad entre hábitats en base a un mismo número de individuos, dando como resultado una curva de valores del índice de diversidad que disminuye conforme el número de individuos (**Novoa Rama et al., 2023**).

La alfa rarefacción tiene relación con los valores obtenidos en el índice de Shannon (Tabla 9), esto indica que la diversidad microbiana dentro de las muestras es comparable en términos de la distribución y abundancia relativa de especies presentes en la muestra. El índice de Shannon es una medida de diversidad que tiene en cuenta tanto la riqueza (número de especies) como la equitatividad (distribución relativa de abundancias).

En la Figura 8 se observa que las dos granjas muestran diversidad alta, lo que sugiere que el número total de secuencias analizadas variaron entre muestras debido al muestreo aleatorio, por lo que la diversidad biológica en términos de variedad y equidad en la distribución de las especies es comparable entre las dos granjas, es decir son parecidas.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se identificó los puntos para la toma de muestra de agua en las granjas San José y Las Orquídeas, siguiendo el protocolo establecido por las normas INEN 1108. Las muestras fueron tomadas por triplicado en las siguientes ubicaciones: pozo, planta de tratamiento de agua secundaria y bebederos. Estos puntos fueron seleccionados con la finalidad de evaluar la calidad del agua de las granjas antes, durante y después del tratamiento de las aguas de consumo aviar.
- Se evaluó las propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua, empleado el método fotométrico de HANNA. El análisis de las propiedades fisicoquímicas determinó que el: pH, cobre, hierro, nitratos, zinc, cloro libre, calcio, magnesio, sulfatos y plomo se encuentran dentro de los límites permisibles para ambas granjas. Sin embargo, en la granja Las Orquídeas los valores de dureza (115 mg/L) en el agua sobrepasaron los límites establecidos por las normas INEN 1108 y el Manual de Manejo de Pollos Cobb. Por otro lado, los análisis microbiológicos realizados con MC-Media PAD revelaron que únicamente en la granja Las Orquídeas existió la presencia de *E. coli* (2 UFC/mL) encontrándose dentro de los parámetros permisibles que es menor a 100 UFC/mL.
- Se desarrolló un análisis metagenómico de la microbiota intestinal de pollos de engorde, los resultados revelaron que la taxonomía de los pollos de ambas granjas no varía significativamente pese a ser evaluados frente a la calidad de agua de las diferentes granjas, además los géneros bacterianos dominantes encontrados fueron *Lactobacillus* y *Roumboutsia*. Se puede mencionar que la riqueza y abundancia de los taxones de la microbiota fecal de los pollos de ambas granjas es similar demostrando que la calidad de agua de las granjas San José y Las Orquídeas no es un factor que altera la composición bacteriana de la microbiota de los pollos de engorde.

4.2 Recomendaciones

- Probar modificaciones en cuanto a los puntos de muestreo del agua de consumo aviar en las granjas.
- Efectuar un estudio más amplio donde se evalúe otros factores que puedan alterar la microbiota intestinal de los pollos como la alimentación, administración de antibióticos, el clima y la ubicación geográfica.
- Realizar el análisis metagenómico incluyendo 18S e ITS, utilizando un mayor número de muestras para la secuenciación de ADN con la finalidad de tener un contraste más amplio de diversidad y abundancia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adetunji, A., Casey, T., Franco, J., Shah, D., & Fasina, Y. (2022). Proteomic analysis of the effect of salmonella challenge on broiler chicken. *Molecules*, 27(21). <https://doi.org/10.3390/molecules27217277>
- Agrocalidad. (2023). *Guía de buenas prácticas avícolas*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2023/03/Gu%C3%ADa-de-Buenas-Pr%C3%A1cticas-Av%C3%ADcolas-jul.pdf>
- Ajata Durán, L. A. (2021). *Evaluación de la calidad microbiológica del agua y canales durante la cosecha de pollos en el Centro de Investigación y Enseñanza Avícola de Zamorano* (CIEAZ). <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/ce1cb938-7335-4ad3-97db-3398b0c15d36/content>
- Alshamy, Z., Richardson, K. C., Hünigen, H., Hafez, H. M., Plendl, J., & Al Masri, S. (2018). Comparison of the gastrointestinal tract of a dual-purpose to a broiler chicken line: A qualitative and quantitative macroscopic and microscopic study. *PLoS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204921>
- Alvarado, J., & Hernández, E. (2023). *La importancia de la microbiota intestinal en la fisiología y rendimiento de pollos de engorde y gallinas de postura*. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v18i2.1795>
- Alvarenga, B. O., Paiva, J. B., Souza, A. I. S., Rodrigues, D. R., Tizioto, P. C., & Ferreira, A. J. P. (2023). Metagenomics analysis of the morphological aspects and bacterial composition of broiler feces. *Poultry Science*, 102(2). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102401>
- Alyileili, S. R., El-Tarabily, K. A., Belal, I. E. H., Ibrahim, W. H., Sulaiman, M., & Hussein, A. S. (2020). Intestinal development and histomorphometry of broiler chickens fed *Trichoderma reesei* degraded date seed diets. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00349>
- Andermann, T., Antonelli, A., Barrett, R. L., & Silvestro, D. (2022). Estimating Alpha, Beta, and Gamma Diversity Through Deep Learning. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.839407>

- Aruwa, C. E., Pillay, C., Nyaga, M. M., & Sabiu, S. (2021). Poultry gut health – microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies. In *Journal of Animal Science and Biotechnology* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00640-9>
- Augusto, E., Aleixo, J., Chilala, F. D., Chilundo, A. G., Gaspar, B., & Bila, C. G. (2022). Physical, chemical and microbiological assessments of drinking water of small-layer farms. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 89(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v89i1.2067>
- Awad, E. A., Najaa, M., Zulaikha, Z. A., Zulkifli, I., & Soleimani, A. F. (2020). Effects of heat stress on growth performance, selected physiological and immunological parameters, caecal microflora, and meat quality in two broiler strains. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(5), 778–7787. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0208>
- Babatunde, O. O., Park, C. S., & Adeola, O. (2021). Nutritional potentials of atypical feed ingredients for broiler chickens and pigs. In *Animals* (Vol. 11, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11051196>
- Ballou, A. L., Ali, R. A., Mendoza, M. A., Ellis, J. C., Hassan, H. M., Croom, W. J., & Koci, M. D. (2016). Development of the chick microbiome: How early exposure influences future microbial diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00002>
- Biasato, I., Ferrocino, I., Grego, E., Dabbou, S., Gai, F., Gasco, L., Cocolin, L., Capucchio, M. T., & Schiavone, A. (2019). Gut microbiota and mucin composition in female broiler chickens fed diets including yellow mealworm (*Tenebrio molitor*, L.). *Animals*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/ani9050213>
- Bindari, Y. R., & Gerber, P. F. (2022). Centennial Review: Factors affecting the chicken gastrointestinal microbial composition and their association with gut health and productive performance. In *Poultry Science* (Vol. 101, Issue 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101612>
- Bortoluzzi, C., Vieira, B. S., & Applegate, T. J. (2020). Influence of dietary zinc, copper, and manganese on the intestinal health of broilers under eimeria challenge. In

Frontiers in Veterinary Science (Vol. 7). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00013>

- Boumedous, C., Djerrou, Z., & Pacha, Y. H. (2017). Impact of drinking water treatment on poultry health and performances: An experimental study. *OnLine Journal of Biological Sciences*, *17*(1), 1–6. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2017.1.6>
- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2018). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(4), 1125–1139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>
- Büker, O., Stolt, K., Kroner, C., Benkova, M., Pavlas, J., & Seypka, V. (2021). Investigations on the influence of total water hardness and ph value on the measurement accuracy of domestic cold water meters. *Water (Switzerland)*, *13*(19). <https://doi.org/10.3390/w13192701>
- Cai, X., Chen, X., Yin, N., Du, H., Sun, G., Wang, L., Xu, Y., Chen, Y., & Cui, Y. (2017). Estimation of the bioaccessibility and bioavailability of Fe, Mn, Cu, and Zn in Chinese vegetables using the in vitro digestion/Caco-2 cell model: the influence of gut microbiota. *Food and Function*, *8*(12), 4592–4600. <https://doi.org/10.1039/C7FO01348E>
- Cao, S. T., Tran, H. P., Thi, H., Le, T., Phung, H., Bui, K., Giang, & Nguyen, T. H., Lam, & Nguyen, T., Nguyen, B. T., Luong, A. D., Vn Giang, B. G., & Nguyen, L. T. (2021). *Impacts of effluent from different livestock farm types (pig, cow, and poultry) on surrounding water quality: a comprehensive assessment using individual parameter evaluation method and water quality indices*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14284-9/Published>
- Chen, P., Xu, T., Zhang, C., Tong, X., Shaukat, A., He, Y., Liu, K., & Huang, S. (2022). Effects of probiotics and gut microbiota on bone metabolism in chickens: A Review. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12101000>
- Choi, K. Y., Lee, T. K., & Sul, W. J. (2015). Metagenomic analysis of chicken gut microbiota for improving metabolism and health of chickens - A review. In *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* (Vol. 28, Issue 9, pp. 1217–1225). Asian-

Australasian Association of Animal Production Societies.
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0026>

Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. In *Poultry Science* (Vol. 97, Issue 3, pp. 1006–1021). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex359>

Clavijo, V., Morales, T., Vives-Flores, M. J., & Reyes Muñoz, A. (2022). The gut microbiota of chickens in a commercial farm treated with a Salmonella phage cocktail. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04679-6>

Cobb Vantress. (2019). *Pollo de engorde. Guía de manejo*. https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/ec35b0ab1e/Broiler-Guide-2019-ESP-WEB_2.22.2019.pdf

Cobb Vantress. (2022). *Cobb500 Broiler performance and nutrition suplement*. <https://www.cobb->

Comisión Nacional de Sanidad Avícola. (2018). *Manejo de la calidad del agua de bebida en granjas avícolas*. http://www.colveterinariossfe.com.ar/2016datos/Manual_procedimiento_Manejo_calidad_agua_Bebida_granjas_%20avi%CC%81colas.pdf

CONAVE. (2021). *Guía de buenas prácticas avícolas*. <https://conave.org/wp-content/uploads/2018/07/Guia-de-Buenas-Practicas-Avicolas-MAGAP-AGROCALIDAD.pdf>

Cuccato, M., Rubiola, S., Giannuzzi, D., Grego, E., Pregel, P., Divari, S., & Cannizzo, F. T. (2021). 16s rRNA sequencing analysis of the gut microbiota in broiler chickens prophylactically administered with antimicrobial agents. *Antibiotics*, 10(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020146>

da Rosa, G., Alba, D. F., Silva, A. D., Gris, A., Mendes, R. E., Mostardeiro, V. B., Lopes, T. F., Schetinger, M. R. C., Stefani, L. M., Lopes, M. T., Boiago, M. M., & da Silva, A. S. (2020). Impact of *Escherichia coli* infection in broiler breeder chicks: The effect of oxidative stress on weight gain. *Microbial Pathogenesis*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103861>

- Dalecki, A. G., Crawford, C. L., & Wolschendorf, F. (2017). Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 70, pp. 193–260). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.01.007>
- De Cesare, A., Palma, F., Lucchi, A., Pasquali, F., & Manfreda, G. (2018). Microbiological profile of chicken carcasses: A comparative analysis using shotgun metagenomic sequencing. *Italian Journal of Food Safety*, 7(1), 62–67. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6923>
- De Grande, A., Leleu, S., Delezie, E., Rapp, C., De Smet, S., Goossens, E., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., & Ducatelle, R. (2020). Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. *Poultry Science*, 99(1), 441–453. <https://doi.org/10.3382/ps/pez525>
- Del Chierico, F., Trapani, V., Petito, V., Reddel, S., Pietropaolo, G., Graziani, C., Masi, L., Gasbarrini, A., Putignani, L., Scaldaferrì, F., & Wolf, F. I. (2021). Dietary magnesium alleviates experimental murine colitis through modulation of gut microbiota. *Nutrients*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/nu13124188>
- Di Martino, G., Piccirillo, A., Giacomelli, M., Comin, D., Gallina, A., Capello, K., Buniolo, F., Montesissa, C., & Bonfanti, L. (2018). Microbiological, chemical and physical quality of drinking water for commercial turkeys: A cross-sectional study. *Poultry Science*, 97(8), 2880–2886. <https://doi.org/10.3382/ps/pey130>
- Dittoe, D. K., Olson, E. G., & Ricke, S. C. (2022). Impact of the gastrointestinal microbiome and fermentation metabolites on broiler performance. *Poultry Science*, 101(5). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101786>
- Ducatelle, R., Goossens, E., Eeckhaut, V., & Van Immerseel, F. (2023). Poultry gut health and beyond. *Animal Nutrition*, 13, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.03.005>
- Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., & Shakeri, M. (2023). Mitigating the Adverse Effects of Lead and Cadmium Heavy Metals-Induced Oxidative Stress by Phytochemical Compounds in Poultry. *Poultry*, 2(2), 235–251. <https://doi.org/10.3390/poultry2020019>

- El Sabry, M. I., Romeih, Z. U., Stino, F. K. R., Khosht, A. R., & Aggrey, S. E. (2023). Water scarcity can be a critical limitation for the poultry industry. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 55, Issue 3). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03599-z>
- Elbaz, A., & El-sheikh, S. (2020). Effect of dietary probiotic, antibiotic or combination on broiler performance, cecum microbial population and ileal development. *Mansoura Veterinary Medical Journal*, 21(3), 74–79. <https://doi.org/10.35943/mvmj.2020.21.313>
- Elokil, A. A., Abouelezz, K. F. M., Ahmad, H. I., Pan, Y., & Li, S. (2020). Investigation of the impacts of antibiotic exposure on the diversity of the gut microbiota in chicks. *Animals*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ani10050896>
- Fancher, C. A., Zhang, L., Kiess, A. S., Adhikari, P. A., Dinh, T. T. N., & Sukumaran, A. T. (2020). Avian pathogenic *Escherichia coli* and *clostridium perfringens*: Challenges in no antibiotics ever broiler production and potential solutions. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 10, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101533>
- Fathima, S., Shanmugasundaram, R., Adams, D., & Selvaraj, R. K. (2022). Gastrointestinal microbiota and their manipulation for improved growth and performance in chickens. In *Foods* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11101401>
- García, M. O., Jiménez, H. L., Bonilla, C., Castiblanco, P., Villar, G., & Casarín Alberto. (2020). *Importancia de la microbiota intestinal de las aves y su posible regulación con el uso de fibras*. <https://www.researchgate.net/publication/344498781>
- Gerritsen, J., Hornung, B., Renckens, B., van Hijum, S. A. F. T., Martins dos Santos, V. A. P., Rijkers, G. T., Schaap, P. J., de Vos, W. M., & Smidt, H. (2017). Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIBT reveals adaptation to the small intestine. *PeerJ*, 2017(9). <https://doi.org/10.7717/peerj.3698>
- Gieco, A., Venturino, J., Ormaechea, M., Spizzo, S., Dragan, A., Sequin, C., Rosenbrock, A., & Reynafé, M. (2020). *Estudio de la calidad del agua de bebida para aves en granjas avícolas de la región centro-oeste de la provincia de Entre Ríos. Granjas de postura comercial*. <https://pcient.uner.edu.ar/index.php/Scdyt/article/view/846/840>

- Gong, J., Si, W., Forster, R. J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C., & Han, Y. (2007). 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*, *59*(1), 147–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x>
- Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., & Zeglin, L. H. (2018). The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. In *Journal of Avian Biology* (Vol. 49, Issue 11). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jav.01788>
- Guo, P., Lin, S., Lin, Q., Wei, S., Ye, D., & Liu, J. (2023). The digestive tract histology and geographical distribution of gastrointestinal microbiota in yellow-feather broilers. *Poultry Science*, *102*(10). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102844>
- H&N International. (2022). *Calidad de agua para aves de postura*. <https://hn-int.com/wp-content/uploads/2022/01/1021-HN-water-quality-laying-hens-SPA.pdf>
- HANNA instruments. (2022). *Manual de instrucciones | HANNA instruments. Manuales y Hojas de Seguridad*. <https://hannainst.ec/descargas/?q=HI%2083399&catid=265&limit=60>
- Hassan, M. (2019). Determination of the Hardness Level of Underground Water in Khost City, Afghanistan. In *International Journal of Innovative Science and Research Technology* (Vol. 4, Issue 10). www.ijisrt.com112
- Jagaba, A. H., Kutty, S. R. M., Hayder, G., Baloo, L., Abubakar, S., Ghaleb, A. A. S., Lawal, I. M., Noor, A., Umaru, I., & Almahbashi, N. M. Y. (2020). Water quality hazard assessment for hand dug wells in Rafin Zurfi, Bauchi State, Nigeria. *Ain Shams Engineering Journal*, *11*(4), 983–999. <https://doi.org/10.1016/j.asej.2020.02.004>
- Jha, R., & Mishra, P. (2021). Dietary fiber in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, performance, gut health, and on the environment: a review. In *Journal of Animal Science and Biotechnology* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00576-0>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and

- strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jurburg, S. D., Brouwer, M. S. M., Ceccarelli, D., van der Goot, J., Jansman, A. J. M., & Bossers, A. (2019). Patterns of community assembly in the developing chicken microbiome reveal rapid primary succession. *MicrobiologyOpen*, 8(9).
<https://doi.org/10.1002/mbo3.821>
- Juricova, H., Matiasovicova, J., Faldynova, M., Sebkova, A., Kubasova, T., Prikrylova, H., Karasova, D., Crhanova, M., Havlickova, H., & Rychlik, I. (2022). Probiotic Lactobacilli do not protect chickens against Salmonella Enteritidis infection by competitive exclusion in the Intestinal tract but in feed, outside the chicken host. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020219>
- Kafle, B. P. (2020). Application of UV–VIS spectrophotometry for chemical analysis. In *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry* (pp. 79–145). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814866-2.00005-1>
- Kang, K., Hu, Y., Wu, S., & Shi, S. (2021). Comparative metagenomic analysis of chicken gut microbial community, function, and resistome to evaluate noninvasive and cecal sampling resources. *Animals*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/ani11061718>
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Arjan Stegeman, J., Smidt, H., & Hermes, G. D. A. (2022). Conserved developmental trajectories of the cecal microbiota of broiler chickens in a field study. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(9).
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiac090>
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Lamot, D. M., Stegeman, J. A., & Smidt, H. (2019). Take care of the environment: housing conditions affect the interplay of nutritional interventions and intestinal microbiota in broiler chickens. *Animal Microbiome*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0009-z>
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., & Smidt, H. (2018). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue FEB). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235>

- Kim, E., Morgan, N. K., Moss, A. F., Li, L., Ader, P., & Choct, M. (2022). Characterisation of undigested components throughout the gastrointestinal tract of broiler chickens fed either a wheat- or maize-based diet. *Animal Nutrition*, 8(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.011>
- Knight, L. C., Wang, M., Donovan, S. M., & Dilger, R. N. (2019). Early-Life Iron Deficiency and Subsequent Repletion Alters Development of the Colonic Microbiota in the Pig. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00120>
- Kociova, S., Dolezelikova, K., Horky, P., Skalickova, S., Baholet, D., Bozdechova, L., Vaclavkova, E., Belkova, J., Nevrkla, P., Skladanka, J., Do, T., Zitka, O., Haddad, Y., Kopel, P., Zurek, L., Adam, V., & Smerkova, K. (2020). Zinc phosphate-based nanoparticles as alternatives to zinc oxide in diet of weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00458-x>
- Kumar Awasthi, M., Ravindran, B., Sarsaiya, S., Chen, H., Wainaina, S., Singh, E., Liu, T., Kumar, S., Pandey, A., Singh, L., & Zhang, Z. (2020). Metagenomics for taxonomy profiling: tools and approaches. In *Bioengineered* (Vol. 11, Issue 1, pp. 356–374). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1736238>
- Kumar, S., Chen, C., Indugu, N., Werlang, G. O., Singh, M., Kim, W. K., & Thippareddi, H. (2018). Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192450>
- Laudadio, I., Fulci, V., Stronati, L., & Carissimi, C. (2019). Next-Generation Metagenomics: Methodological Challenges and Opportunities. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 23(7), 327–333. <https://doi.org/10.1089/omi.2019.0073>
- Le Roy, C. I., Woodward, M. J., Ellis, R. J., La Ragione, R. M., & Claus, S. P. (2019). Antibiotic treatment triggers gut dysbiosis and modulates metabolism in a chicken model of gastro-intestinal infection. *BMC Veterinary Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1761-0>
- Li, A., An, Z., Li, C., Cui, X., Li, K., Zhou, H., Zhou, B., Hao, P., Kulyar, M. F., Yin, W., Wan, X., Li, L., Luo, Z., Hassan, M. W., & Wu, Y. (2023). Salt-contaminated water

- exposure induces gut microbial dysbiosis in chickens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114731>
- Li, J., Hao, H., Cheng, G., Liu, C., Ahmed, S., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Dai, M., & Yuan, Z. (2017). Microbial shifts in the intestinal microbiota of Salmonella infected chickens in response to enrofloxacin. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01711>
- Liang, P., Yu, J., Yang, E., & Peng, L. (2020). Determination of Trace Levels of Lead in Water Samples by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry After Dispersive Liquid-liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop. In *Atomic Spectroscopy* (Vol. 35, Issue 2). <https://doi.org/10.46770/AS.2014.02.005>
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. In *Protein and Cell* (Vol. 12, Issue 5, pp. 315–330). Higher Education Press Limited Company. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Ma, K., Chen, W., Lin, X. Q., Liu, Z. Z., Wang, T., Zhang, J. B., Zhang, J. G., Zhou, C. K., Gao, Y., Du, C. T., & Yang, Y. J. (2023). Culturing the Chicken Intestinal Microbiota and Potential Application as Probiotics Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24033045>
- Macha, E. (2019). *Determinación de cadmio, arsénico y plomo por espectrofotometría de absorción atómica en aguas de pozo de Castillo Grande*. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11630/Macha_me.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mahmood, T., & Guo, Y. (2020). Dietary fiber and chicken microbiome interaction: Where will it lead to? In *Animal Nutrition* (Vol. 6, Issue 1, pp. 1–8). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.11.004>
- Mandal, R. K., Jiang, T., Wideman, R. F., Lohrmann, T., & Kwon, Y. M. (2020). Microbiota analysis of chickens raised under stressed conditions. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.482637>

- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M. P., Gaucher, M. Lou, Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. In *Animal Nutrition* (Vol. 4, Issue 2, pp. 170–178). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
- Memon, F. U., Yang, Y., Zhang, G., Leghari, I. H., Lv, F., Wang, Y., Laghari, F., Khushk, F. A., & Si, H. (2022). Chicken gut microbiota responses to dietary *Bacillus subtilis* probiotic in the presence and absence of eimeria infection. *Microorganisms*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081548>
- Merck KGaA. (2018). Technical Data Sheet MC-Media Pad ® Yeast and Mold. 1–2. https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/MC-Media-Pad-YeastsMolds,MDA_CHEM-132360#documentation
- Milanese, A., Mende, D. R., Paoli, L., Salazar, G., Ruscheweyh, H. J., Cuenca, M., Hingamp, P., Alves, R., Costea, P. I., Coelho, L. P., Schmidt, T. S. B., Almeida, A., Mitchell, A. L., Finn, R. D., Huerta-Cepas, J., Bork, P., Zeller, G., & Sunagawa, S. (2019). Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08844-4>
- Mishra, A. P., Kumar, S., Patra, R., Kumar, A., Sahu, H., Chandra, N., Pande, C. B., & Alshehri, F. (2023). Physicochemical parameters of water and its implications on avifauna and habitat quality. *Sustainability (Switzerland)*, *15*(12). <https://doi.org/10.3390/su15129494>
- Mustedanagic, A., Matt, M., Weyermair, K., Schrattecker, A., Kubitz, I., Firth, C. L., Loncaric, I., Wagner, M., & Stessl, B. (2023). Assessment of microbial quality in poultry drinking water on farms in Austria. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1254442>
- Naili, S., Boucheker, A., Gherib, A., Djelloul, R., & Lazli, A. (2021). Seasonal variation in physicochemical characteristics and lead contamination of Lake Tonga and their effects on waterbird populations. In *Ukrainian Journal of Ecology*. https://doi.org/10.15421/2021_15

- Navgire, G. S., Goel, N., Sawhney, G., Sharma, M., Kaushik, P., Mohanta, Y. K., Mohanta, T. K., & Al-Harrasi, A. (2022). Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach. In *Biological Procedures Online* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Novoa Rama, E., Bailey, M., Kumar, S., Leone, C., den Bakker, H. C., Thippareddi, H., & Singh, M. (2023). Characterizing the gut microbiome of broilers raised under conventional and no antibiotics ever practices. *Poultry Science*, *102*(8). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102832>
- NTE INEN 1108. (2011). Agua Calidad del Agua, Muestreo, Diseño de los programas de muestreo (Primera edición).
- Olukomaiya, O., Fernando, C., Mereddy, R., Li, X., & Sultanbawa, Y. (2019). Solid-state fermented plant protein sources in the diets of broiler chickens: A review. In *Animal Nutrition* (Vol. 5, Issue 4, pp. 319–330). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.05.005>
- Osei, F. B., Boamah, V. E., Agyare, C., & Abaidoo, R. C. (2019). Physicochemical properties and microbial quality of water used in selected poultry farms in The Ashanti Region of Ghana. *The Open Microbiology Journal*, *13*(1), 121–127. <https://doi.org/10.2174/1874285801913010121>
- Osuna-Prieto, F. J., Xu, H., Ortiz-Alvarez, L., Di, X., Kohler, I., Jurado-Fasoli, L., Rubio-Lopez, J., Plaza-Díaz, J., Vilchez-Vargas, R., Link, A., Gil, A., Ruiz, J. R., Rensen, P. C. N., & Martinez-Tellez, B. (2023). The relative abundance of fecal bacterial species belonging to the Firmicutes and Bacteroidetes phyla is related to plasma levels of bile acids in young adults. *Metabolomics*, *19*(6). <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02016-8>

- PANAFTOSA. (2017). *Manual Veterinario de Toma y Envío de Muestras*.
<http://www.agricultura.gov.br/>
- Pandit, R. J., Hinsu, A. T., Patel, N. V., Koringa, P. G., Jakhesara, S. J., Thakkar, J. R., Shah, T. M., Limon, G., Psifidi, A., Guitian, J., Hume, D. A., Tomley, F. M., Rank, D. N., Raman, M., Tirumurugaan, K. G., Blake, D. P., & Joshi, C. G. (2018). Microbial diversity and community composition of caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA amplicon sequencing. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0501-9>
- Plata Esparza, M. R. (2020). *Manual de manejo y tratamiento del agua de la granja avícola*.
<https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/f40a0d08-0118-46ba-ba2a-2d7d0e70cccf/content>
- Pontin, K. P., Borges, K. A., Furian, T. Q., Carvalho, D., Wilsmann, D. E., Cardoso, H. R. P., Alves, A. K., Chitolina, G. Z., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. de S., & do Nascimento, V. P. (2021). Antimicrobial activity of copper surfaces against biofilm formation by *Salmonella Enteritidis* and its potential application in the poultry industry. *Food Microbiology*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103645>
- Qi, Z., Shi, S., Tu, J., & Li, S. (2019). Comparative metagenomic sequencing analysis of cecum microbial diversity and function in broilers and layers. *3 Biotech*, 9(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1834-1>
- Ravindran, V., & Reza Abdollahi, M. (2021). Nutrition and digestive physiology of the broiler chick: State of the art and outlook. In *Animals* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani11102795>
- Ricke, S. C., & Rothrock, M. J. (2020). Gastrointestinal microbiomes of broilers and layer hens in alternative production systems. *Poultry Science*, 99(2), 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.017>
- Robinson, K., Becker, S., Xiao, Y., Lyu, W., Yang, Q., Zhu, H., Yang, H., Zhao, J., & Zhang, G. (2019). Differential impact of subtherapeutic antibiotics and ionophores on intestinal microbiota of broilers. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090282>
- Ross. (2018). *Manual de manejo de la reproductora Ross*. www.aviagen.com.

- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. In *Poultry Science* (Vol. 98, Issue 4, pp. 1791–1804). Oxford University Press. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Rychlik, I., Karasova, D., & Crhanova, M. (2023). Microbiota of chickens and their environment in commercial production. In *Avian Diseases* (Vol. 67, Issue 1, pp. 1–9). American Association of Avian Pathologists. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-22-00048>
- Saleh, N. A., Ayoub, M. A., Nossair, M. A., Alqhtani, A. H., Swelum, A. A., Khojah, H., Gamal, M., Imam, M. S., Khafaga, A. F., Arif, M., & Abd El-Hack, M. E. (2023). Influence of water quality and pollution on broiler's performance, vaccine and antibiotic efficiencies. *Annals of Animal Science*. <https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0023>
- Sari, A. B., Gunes, Y., Anlas, C., Alkan, F. U., Guncum, E., Ustuner, O., & Bakirel, T. (2022). Effects of feed intake and water hardness on fluralaner pharmacokinetics in layer chickens. *Journal of Veterinary Science*, 23(5). <https://doi.org/10.4142/jvs.22048>
- Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B., & Kim, W. K. (2018). Chicken gut microbiota: Importance and detection technology. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 5, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00254>
- Shannon, M. C., & Hill, G. M. (2019). Trace mineral supplementation for the intestinal health of young monogastric animals. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 6, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00073>
- She, Y., Cai, H., & Liu, G. (2018). Effects of antibiotic on microflora in ileum and cecum for broilers by 16S rRNA sequence analysis. *Animal Science Journal*, 89(12), 1680–1691. <https://doi.org/10.1111/asj.13113>
- Shi, Y., Zhang, L., Do, K. A., Peterson, C. B., & Jenq, R. R. (2020). PCoA: Covariate adjusted principal coordinates analysis. *Bioinformatics*, 36(13), 4099–4101. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa276>
- Shokryazdan, P., Faseleh, M., Liang, J., Ramasamy, K., Sieo, C. C., & Wan, Y. H. (2017). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and

- serum lipids of broiler chickens. *PLoS ONE*, 12(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175959>
- Siegerstetter, S. C., Schmitz-Esser, S., Magowan, E., Wetzels, S. U., Zebeli, Q., Lawlor, P. G., O'Connell, N. E., & Metzler-Zebeli, B. U. (2017). Intestinal microbiota profiles associated with low and high residual feed intake in chickens across two geographical locations. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187766>
- Silvestre, R., & Torrado, E. (2018). *Metabolic Interaction in Infection*.
<http://www.springer.com/series/4822>
- Sinha, R., Zhao, N., Goedert, J. J., Byrd, D. A., Wan, Y., Hua, X., Hullings, A. G., Knight, R., Breda, S. van, Mathijs, K., de Kok, T. M., Ward, M. H., Pieters, H. J., Sági-Kiss, V., Kuhnle, G. G., Georgiadis, P., Saccani, G., Parolari, G., Virgili, R., ... Helvoirt, J. H. van. (2021). Effects of processed meat and drinking water nitrate on oral and fecal microbial populations in a controlled feeding study. *Environmental Research*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111084>
- Skalny, A. V., Aschner, M., Lei, X. G., Gritsenko, V. A., Santamaria, A., Alekseenko, S. I., Prakash, N. T., Chang, J. S., Sizova, E. A., Chao, J. C. J., Aaseth, J., & Tinkov, A. A. (2021). Gut microbiota as a mediator of essential and toxic effects of zinc in the intestines and other tissues. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222313074>
- Souffriau, J., Timmermans, S., Vanderhaeghen, T., Wallaey, C., Van Looveren, K., Aelbrecht, L., Dewaele, S., Vandewalle, J., Goossens, E., Verbanck, S., Boyen, F., Eggermont, M., De Commer, L., De Rycke, R., De Bruyne, M., Tito, R., Ballegeer, M., Vandevyver, S., Velho, T., ... Libert, C. (2020). Zinc inhibits lethal inflammatory shock by preventing microbe-induced interferon signature in intestinal epithelium. *EMBO Molecular Medicine*, 12(10). <https://doi.org/10.15252/emmm.201911917>
- Sundar Paul, S., Nath Chatterjee, R., Venkata Lakshmi Narasimha Raju, M., Prakash, B., Venkata Rama Rao, S., Pal Yadav, S., & Kannan, A. (2020). *Gut microbiome composition differs extensively between indian indigenous chicken breeds originated in different geographical locations and a commercial broiler line, but breed-specific as well as across-breed core microbiomes are found*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-113326/v1>

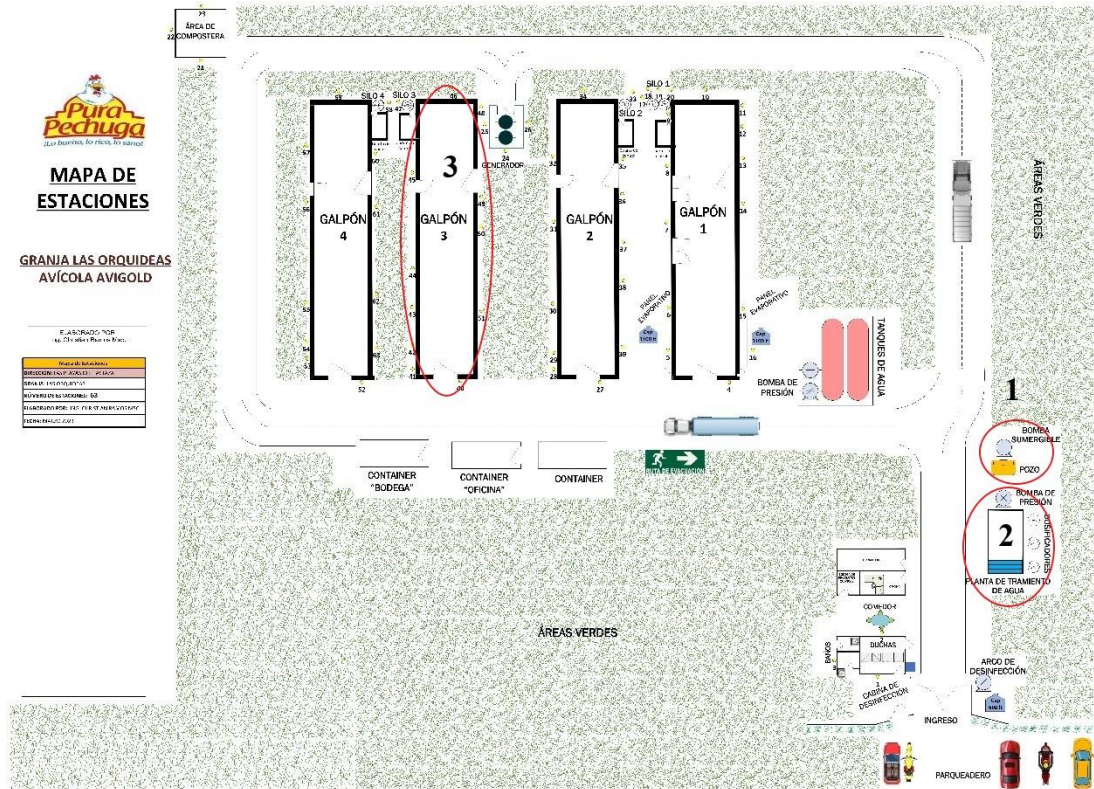
- Swelum, A. A., Elbestawy, A. R., El-Saadony, M. T., Hussein, E. O. S., Alhotan, R., Suliman, G. M., Taha, A. E., Ba-Awadh, H., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2021). Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope with the first-week mortality in chicks: an updated overview. In *Poultry Science* (Vol. 100, Issue 5). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101039>
- Tejeda, O. J., & Kim, W. K. (2021). Role of dietary fiber in poultry nutrition. In *Animals* (Vol. 11, Issue 2, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11020461>
- Tizard, M. L., Jenkins, K. A., Cooper, C. A., Woodcock, M. E., Challagulla, A., & Doran, T. J. (2019). Potential benefits of gene editing for the future of poultry farming. *Transgenic Research*, 28, 87–92. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00139-0>
- Vanhaecke, T., Bretin, O., Poirel, M., & Tap, J. (2022). Drinking water source and intake are associated with distinct gut microbiota signatures in US and UK populations. *Journal of Nutrition*, 152(1), 171–182. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab312>
- Varón López, M., Ospina Barrero, M., Ospina Céspedes, L., Bonilla Caballero, M., Lozano Puentes, M y Ramírez Trujillo, R. (2023). Resistencia a los antimicrobianos asociados a la cama de pollo de engorde. (1ª. Ed.).Sello Editorial Universidad del Tolima.
- Vega, S., Montoro, L., & Marín, C. (2022). *Microbiota intestinal en avicultura: el órgano olvidado*. www.ergon.es
- Velasco, E., Wang, S., Sanet, M., Fernández-Vázquez, J., Jové, D., Glaría, E., Valledor, A. F., O'Halloran, T. V., & Balsalobre, C. (2018). A new role for Zinc limitation in bacterial pathogenicity: Modulation of α -hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24964-1>
- Vergnes, A., Viala, J. P. M., Ouadah-Tsabet, R., Pocachard, B., Loiseau, L., Méresse, S., Barras, F., & Aussel, L. (2017). The iron–sulfur cluster sensor IscR is a negative regulator of Spil type III secretion system in *Salmonella enterica*. *Cellular Microbiology*, 19(4). <https://doi.org/10.1111/cmi.12680>
- Viso, N. P., Redondo, E., Carrasco, J. M. D., Redondo, L., Garcia, J. S., Miyakawa, M. F., & Farber, M. D. (2021). Geography as non-genetic modulation factor of chicken cecal microbiota. *PLoS ONE*, 16(1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244724>

- Vitetta, L., Llewellyn, H., & Oldfield, D. (2019). Gut dysbiosis and the intestinal microbiome: *Streptococcus thermophilus* a key probiotic for reducing uremia. In *Microorganisms* (Vol. 7, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080228>
- Wang, M., Jiang, M., Wang, Z., Chen, R., Zhuge, X., & Dai, J. (2021). Characterization of antimicrobial resistance in chicken-source phylogroup F *Escherichia coli*: similar populations and resistance spectrums between *E. coli* recovered from chicken colibacillosis tissues and retail raw meats in Eastern China. *Poultry Science*, *100*(9). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101370>
- Wang, Y., Sun, F., Lin, W., & Zhang, S. (2022). PCoA: Adjustment for confounding factors using principal coordinate analysis. *PLoS Computational Biology*, *18*(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010184>
- Watkins, S. (2019). *Gestión del agua de bebida en avicultura*. <https://avinews.com/download/gestion-agua-bebida-comprimido.pdf>
- Wei, H., Huang, Y., Santiago, P. J., Labachyan, K. E., Ronaghi, S., Magana, M. P. B., Huang, Y. H., Jiang, S. C., Hochbaum, A. I., & Ragan, R. (2023). Decoding the metabolic response of *Escherichia coli* for sensing trace heavy metals in water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *120*(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.2210061120>
- Weinroth, M. D., Oakley, B., Ramírez, G. A., Reyes, A., Harris, C. E., & Buhr, R. J. (2022). 16S rRNA gene-based assessment of common broiler chicken sampling methods: Evaluating intra-flock sample size, cecal pair similarity, and cloacal swab similarity to other
- Wu, D., Hu, Y., Cheng, H., & Ye, X. (2023). Detection Techniques for Lead Ions in Water: A Review. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28083601>
- Xing, R., Yang, H., Wang, X., Yu, H., Liu, S., & Li, P. (2020). Effects of calcium source and calcium level on growth performance, immune organ indexes, serum components, intestinal microbiota, and intestinal morphology of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, *29*(1), 106–120. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz033>

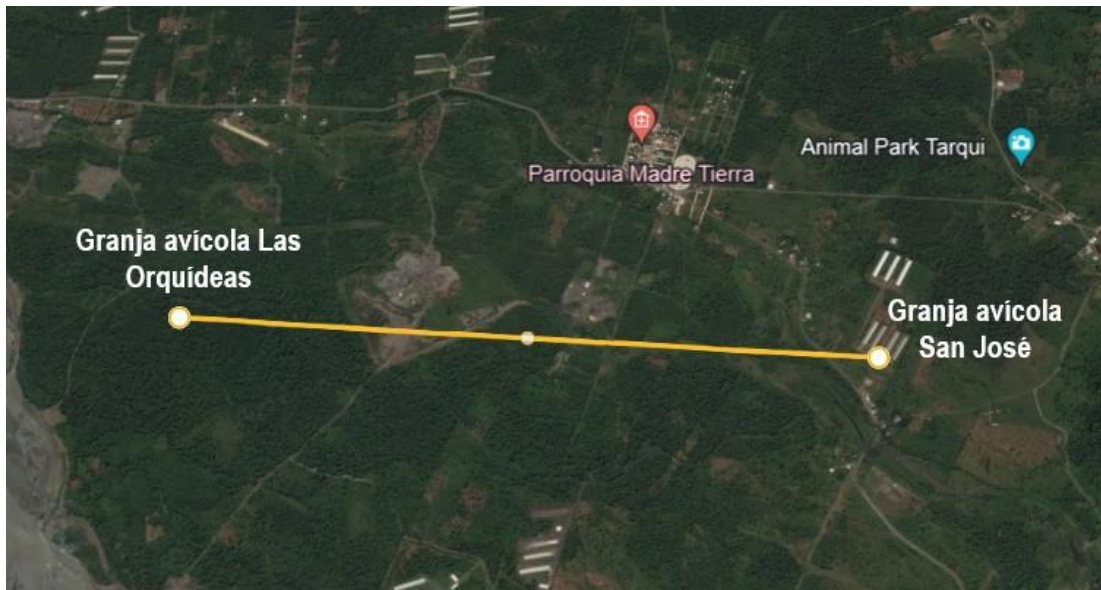
- Yan, R., Lu, M., Zhang, L., Yao, J., Li, S., & Jiang, Y. (2022). Effect of sex on the gut microbiota characteristics of passerine migratory birds. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.917373>
- Yan, R., Lu, M., Zhang, L., Yao, J., Li, S., & Jiang, Y. (2022). Effect of sex on the gut microbiota characteristics of passerine migratory birds. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.917373>
- Yan, W., Sun, C., Yuan, J., & Yang, N. (2017). Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep45308>
- Ye, Y., Li, Z., Wang, P., Zhu, B., Zhao, M., Huang, D., Ye, Y., Ding, Z., Li, L., Wan, G., Wu, Q., Song, D., & Tang, Y. (2021). Effects of probiotic supplements on growth performance and intestinal microbiota of partridge shank broiler chicks. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/peerj.12538>
- Yousef, H. M. Y., Hashad, M. E., Osman, K. M., Alatfeehy, N. M., Hassan, W. M. M., Elebeedy, L. A., Salem, H. M., Shami, A., Al-Saeed, F. A., El-Saadony, M. T., El-Tarabily, K. A., & Marouf, S. (2023). Surveillance of *Escherichia coli* in different types of chicken and duck hatcheries: one health outlook. *Poultry Science*, *102*(12). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103108>
- Zambrano Ponce, N. J. (2019). *Relación entre el consumo de agua cruda y la incidencia de enfermedades en ganado aviar en la granja avícola "Zambrano Ponce."* <https://repositorio.esпам.edu.ec/xmlui/handle/42000/982>
- Zhang, C., Hao, E., Chen, X., Huang, C., Liu, G., Chen, H., Wang, D., Shi, L., Xuan, F., Chang, D., & Chen, Y. (2023). Dietary fiber level improve growth performance, nutrient digestibility, immune and intestinal morphology of broilers from day 22 to 42. *Animals*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/ani13071227>
- Zhang, F., Zheng, W., Guo, R., & Yao, W. (2017). Effect of dietary copper level on the gut microbiota and its correlation with serum inflammatory cytokines in Sprague-Dawley rats. *Journal of Microbiology*, *55*(9), 694–702. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6627-9>

- Zhang, Y., Zhou, J., Dong, Z., Li, G., Wang, J., Li, Y., Wan, D., Yang, H., & Yin, Y. (2019). Effect of Dietary Copper on Intestinal Microbiota and Antimicrobial Resistance Profiles of *Escherichia coli* in Weaned Piglets. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02808>
- Zhou, Q., Lan, F., Li, X., Yan, W., Sun, C., Li, J., Yang, N., & Wen, C. (2021). The Spatial and Temporal Characterization of Gut Microbiota in Broilers. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.712226>
- Zou, Q., Meng, W., Wang, C., Wang, T., Liu, X., & Li, D. (2023). Sodium dichloroisocyanurate: improving broiler health by reducing harmful microbial levels in the waterline. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1234949>

Anexo 2. Puntos de muestreo de agua de la granja Las Orquideas.



Anexo 3. Ubicación geográfica de la granja San José y Las Orquideas.



Anexo 4. *Toma de muestras de agua.*



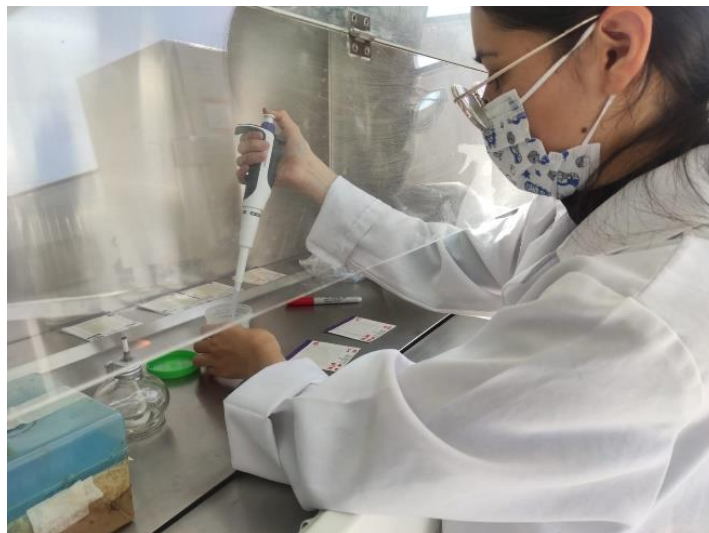
Anexo 5. *Recolección de las muestras de heces de los pollos de engorde de las diferentes granjas.*



Anexo 6. *Análisis fisicoquímico de las muestras de agua por el método de HANNA.*



Anexo 7. *Análisis microbiológico de las muestra de agua con MC-Media PAD.*



Anexo 8. *Extracción de ADN bacteriano con FastDNA SPIN Kit for Soil.*

