

Enfoque metagenómico para la caracterización del microbioma de aves corral. Revisión

Metagenomic approaches for characterization of poultry microbiome. A review

Marcela Judith Mantilla Martínez*, **Rodrigo Gonzalo Torres Sáez****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.78390

RESUMEN

El pollo y el huevo son una fuente importante de proteína para el ser humano a nivel mundial. La producción de estos alimentos se ha intensificado durante los últimos años y se prevé que se produzca alrededor de 150 millones de toneladas de carne de pollo en 2020 (OCDE / FAO, 2018). Sin embargo, uno de los mayores problemas ligados a los procesos de producción avícola lo constituyen las enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos patógenos. Entre los más relevantes se encuentran microorganismos como *Salmonella ssp*, *Campylobacter spp*, y *Escherichia coli*. Por lo tanto, es importante comprender los mecanismos implicados en la colonización de microorganismos patógenos que afectan a las aves de corral y sus interacciones con la microbiota gastrointestinal las cuales son clave en la mejora de la absorción de nutrientes y el fortalecimiento del sistema inmune, que influye en el crecimiento, el bienestar y la salud de las aves de corral. Sin embargo, hay poca información relacionada con la microbiota gastrointestinal de pollos parrilleros y gallinas productoras de huevo. Hasta hace poco, la caracterización se limitaba a los microorganismos que podían recuperarse a través de cultivos tradicionales. Por lo anterior, en el último tiempo se ha intensificado el uso de técnicas moleculares, entre las que se destaca la metagenómica, la cual ofrece una alternativa para una mejor comprensión de las interacciones bacterianas, la identificación de genes de resistencia a los antibióticos, identificación de elementos genéticos móviles, y el diseño de estrategias para intervenciones más efectivas con el objetivo de romper la cadena de transmisión de microorganismos patógenos durante el ciclo de producción avícola. En esta revisión, se describen los principales enfoques metagenómicos para el estudio de microbiomas de aves de corral, las técnicas de secuenciación y herramientas bioinformáticas usadas para su caracterización.

Palabras clave: Metagenómica, 16s RNA, *shotgun*, aves de corral, microbiota gastrointestinal

ABSTRACT

Chicken and eggs are an important source of protein for humans worldwide. Production of these foods has been intensified in recent years and around 150 million tonnes of chicken meat is expected to be produced by 2020 (OECD / FAO, 2018). However, one of the biggest problems linked to poultry production processes are the infectious diseases caused by pathogenic microorganisms. Among the most relevant are found microorganisms such as *Salmonella ssp*, *Campylobacter spp*, and *Escherichia coli*. Therefore, it is important to understand the mechanisms involved in the colonization of pathogenic microorganisms that can affect poultry and their interactions with the gastrointestinal microbiota, which are key in improving nutrient absorption and strengthening the immune system, which it influences the growth, welfare and health of the chicken. However, there is little information related to the gastrointestinal microbiota of chicken. Until recently, the characterization was limited to microorganisms that could be recovered through culture traditional. Therefore, in the last time, it has been intensified use of molecular techniques, among those is remarked metagenomics, which offers an alternative for a better understanding of bacterial interactions, the identification of antibiotic resistance genes, identification of mobile genetic elements, and the design of strategies for more effective interventions with the

* Bióloga. Universidad Industrial de Santander. Estudiante de Doctorado en Ingeniería. Universidad Autónoma de Bucaramanga. mmantilla887@unab.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3858-709>.

** PhD. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Centro de Biotecnología ECOPETROL. Santander. rodrigo.torres@ecopetrol.com.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1113-302>.

aim of breaking the chain of transmission of pathogenic microorganisms during the poultry production cycle. In this review, the main metagenomics approaches are describe aimed to study microbiomes from poultry, sequencing techniques and bioinformatics tools used for its characterization.

Key words: Metagenomics, 16s RNA, *shotgun*, poultry, gastrointestinal microbiome.

Recibido: marzo 11 de 2019 **Aprobado:** Agosto 28 de 2019

INTRODUCCIÓN

La carne de pollo y el huevo se encuentran entre los alimentos de origen animal de alto consumo a nivel mundial (Mottet y Tempio, 2017). La demanda de alimentos derivados de animales está aumentando debido al crecimiento de la población, el aumento de los ingresos y la urbanización (OCDE/FAO, 2014). De esta manera, la carne de pollo ha mostrado la tendencia más rápida en crecimiento en los últimos años. Se estima que se produzcan alrededor de 150 millones de toneladas de carne de pollo en 2020 (OCDE / FAO, 2018). Pese al progreso observado en la explotación avícola, este sector se enfrenta a amenazas significativas como enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos patógenos como *Salmonella ssp*, *Campylobacter spp* y *Escherichia coli*, entre otros (Davies y Wales, 2010). Además, la naturaleza ubicua de estos microorganismos puede crear una fuente constante de contaminación del producto alimenticio, debido a que las aves de corral son uno de los principales reservorios de estos patógenos (Davies y Wales, 2010).

La caracterización del microbioma de aves de corral se centra actualmente en el estudio del tracto gastrointestinal, dado que es el área de mayor abundancia y diversidad bacteriana (O'Hara y Shanahan, 2006), mayor relevancia para la salud del huésped, dado que el mismo desempeña un papel esencial en la digestión y absorción de nutrientes, el desarrollo del sistema inmune y la exclusión de patógenos (Pan y Yu, 2014; Yeoman *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha señalado que la dieta (Hammons *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2009) y los aditivos alimentarios (Amerah *et al.*, 2011; Danzeisen *et al.*, 2011) pueden afectar la microbiota gastrointestinal de las aves de corral con respecto a la diversidad y composición (figura 1). En consecuencia, la microbiota intestinal se ve influenciada por factores genéticos y factores externos como la dieta y el ambiente (Apajalahti *et al.*, 2004; Smulikowska, 2006; Wang *et al.*, 2016; Ballou *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). No obstante, a pesar de la importancia de la microbiota intestinal, y el papel que tiene en la salud y bienestar de las aves de corral (Awad *et al.*, 2016; Stanley *et al.*, 2013), se ha estudiado de manera limitada la composición y diversidad bacteriana dentro del tracto gastrointestinal; adicionalmente el rol

de los microorganismos en el desarrollo de un tracto gastrointestinal saludable aun es desconocido. Se conoce poco sobre la diversidad de este ecosistema, su desarrollo y la respuesta a las infecciones microbianas, principalmente bacterianas, su impacto en el huésped y las interacciones entre la microbiota y el huésped.

Los primeros estudios de las comunidades microbianas se limitaban a métodos convencionales usando medios de cultivo selectivo para el crecimiento bacteriano. (Barnes *et al.*, 1972). Sin embargo, estas técnicas recuperan una fracción minoritaria de los microorganismos. Es decir, para los taxones bacterianos que habitan en el tracto gastrointestinal de las aves de corral, menos del 20% es recuperado a través de este método (Gaskins *et al.*, 2002). Por esta razón, se han utilizado nuevos enfoques de estudio independientes del uso de medios de cultivo, estos hacen uso de herramientas moleculares con el objeto de superar los sesgos presentados y obtener información detallada sobre la diversidad, estructura y función del microbioma.

Entre las técnicas introducidas, se incluye el enfoque molecular de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (Gaskins *et al.*, 2002), electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE) (Zhu *et al.*, 2002) y la técnica del polimorfismo de longitud de fragmento (T-RFLP) (Gong *et al.*, 2008; Torok *et al.*, 2011). De igual manera, la secuenciación de Sanger también ha sido utilizada para estudiar la diversidad de la microbiota intestinal del pollo parrillero (Lu *et al.*, 2003). Aunque estos enfoques son más robustos que los métodos dependientes de cultivo, aún son incapaces de representar con precisión la diversidad del microbioma de las aves, debido a su baja cobertura, rendimiento y sumado a los altos costos que implica su utilización (Choi *et al.*, 2015). En los últimos años, se han introducido técnicas de biología molecular que permiten acceder a la diversidad microbiana de un ecosistema determinado. Estas hacen uso de la secuenciación de próxima generación (NGS), la cual proporciona un análisis a gran escala de la biodiversidad y abundancia de microorganismos (Josefsen *et al.*, 2015). A partir de esta tecnología, es posible desarrollar estudios metagenómicos, facilitando un análisis completo y complejo de las comunidades microbianas (Simon y Daniel, 2011), además, es

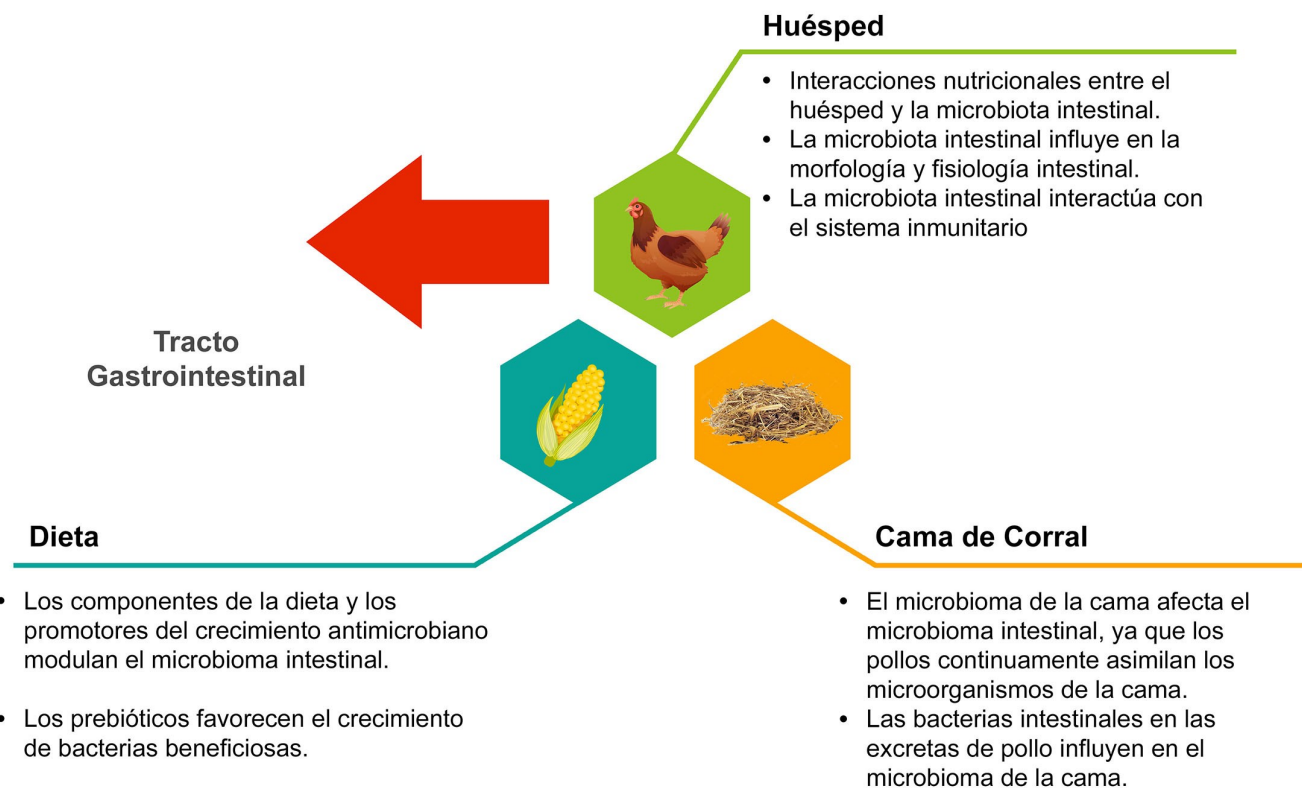


Figura 1. Asociación entre microbioma intestinal, huésped, dieta y microbioma de la cama. (Adaptado de Pan y Yu (2014), Wang *et al.* (2016), Ballou *et al.* (2016)).

posible acceder a información en un único análisis sobre la presencia, proporción, tipo, virulencia, predicción de roles nutricionales y resistencia a antibióticos de un determinado grupo de microorganismos (Josefsen *et al.*, 2015). Por otra parte, este nuevo enfoque metagenómico ha permitido el desarrollo de análisis genómicos funcionales completos para delinear los requisitos genéticos requeridos para la colonización, infección y supervivencia de microorganismos patógenos en condiciones ambientales a las que éste se encuentra expuesto. El desarrollo y la aplicación de tales herramientas novedosas de la metagenómica funcional pueden revelar vulnerabilidades previamente desconocidas, las cuales pueden explorarse para desarrollar nuevas intervenciones y romper la cadena de transmisión de microorganismos patógenos en la industria avícola. El propósito de esta revisión fue estudiar las metodologías utilizadas para análisis metagenómicos, con el fin obtener la taxonomía bacteriana e inferencias funcionales de la microbiota gastrointestinal de aves de corral. Se describe y se analiza el procesamiento de muestras, el tipo de enfoque metagenómico, la tecnología de secuenciación y las herramientas bioinformáticas utilizadas para el análisis de la información.

Recolección y extracción de muestras de ADN

El procesamiento de muestras es el primer paso en los proyectos metagenómicos. El ADN extraído debe ser representativo de todas las células presentes en la muestra y debe ser idóneo para la generación de las bibliotecas genómicas. Actualmente están disponibles diferentes métodos de extracción de ADN para cada tipo de muestra (e.g. muestras fecales, suelo) (Wise y Siragusa, 2007; Hang *et al.*, 2014; Josefsen *et al.*, 2015). Sin embargo, la selección del método óptimo no está determinada (Hamady y Knight, 2009). Existen diferentes kits de extracción de ADN, la mayoría de estos utilizan lisis celular, eliminación de macromoléculas diferentes a ácidos nucleicos y recolección del ADN. En general, la lisis es la estrategia más aplicada y de mayor relevancia, puesto que la intensidad de la lisis puede dar lugar a un sesgo hacia un grupo taxonómico en particular (Josefsen *et al.*, 2015). Por tal razón, es necesario utilizar una combinación de medios químicos, físicos y mecánicos para lisar las células de manera eficiente. Trabajos previos recomiendan el uso combinado de los tres, específicamente cuando se analizan comunidades microbianas complejas (Yu y Morrison, 2004; Josefsen *et al.*, 2015; Burbach *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Para la extracción eficiente de ADN de muestras particulares como las heces o el intestino de las aves se requiere de gran cuidado ya que son una clase de muestras divergentes y de variabilidad en composición (Gill, 2014). Lo anterior está dado por las diferencias encontradas en la fisiología del tracto digestivo de las aves y la forma de procesamiento del alimento (Wise y Siragusa, 2007). Esto hace que la extracción de ADN del microbioma de las aves sea un desafío, por ejemplo, debido al alto contenido de e.g. ácido úrico y sustancias húmicas encontradas en las muestras (Eriksson *et al.*, 2017). De acuerdo con la literatura el protocolo más común de extracción de ADN en muestras de heces y ciego intestinal ha sido el planteado por Yu y Morrison (2004), al igual que el Kit de extracción QIAmpH DNA Stool Mini Kit (tabla1).

Por otra parte, estudios recientes han sugerido cambios en la microbiota gastrointestinal en pollos recién nacidos asociados a factores contaminantes fecales o ambientales, adheridos a la cáscara de los huevos (Donaldson *et al.*, 2017). El estudio realizado por Lee *et al.* (2019), ha indicado que más del 50% de la diversidad de la microbiota de la clara de huevo y del intestino del embrión tiene su origen a partir de la microbiota de la cáscara de huevo. Del mismo modo, sugieren que la microbiota de la cloaca y del oviducto materno posiblemente determina la microbiota de la cáscara de huevos.

De esta manera, se han incluido técnicas para recuperar el ADN en muestras de cáscara de huevo, como el aislamiento de ADN basado en la resina chelex (Martín-Platero *et al.*, 2010). Este protocolo ha sido ampliamente utilizado para muestras de diferentes orígenes por su bajo costo y simplicidad. Para realizar el aislamiento de muestras de cáscaras de huevos, el procedimiento indica que los huevos deben limpiarse con un hisopo estéril, luego éste debe ser almacenado en una solución fosfato en un tubo de microcentrífuga hasta la extracción del ADN. Para la obtención del ADN, las células bacterianas se recolectan por varias etapas de centrifugación. Posteriormente, se procede a realizar la extracción de ADN a partir del sedimento recolectado (Martín-Platero *et al.*, 2010). No obstante la sencillez del protocolo mencionado, el método de frotis de la cáscara de huevos presenta diferencias en los perfiles de las comunidades bacterianas y una menor eficiencia en la extracción comparado con el método de trituración de la cáscara de huevo (Grizard *et al.*, 2014). En este último, se utiliza nitrógeno líquido para la trituración de las cáscaras de huevo, el polvo obtenido se procesa utilizando el Kit NucleoSpin Soil Kit (Grizard *et al.*, 2014).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente es de interés optimizar un protocolo de extracción de ADN de alto rendimiento para muestras aviares, con el fin de obtener una representación correcta del microbioma estudiado.

Estudios de Microbioma

Los estudios metagenómicos para el análisis de microbioma se pueden clasificar en dos categorías; estudios de amplicón dirigidos, los cuales se centran en uno o varios genes marcadores para revelar la composición y diversidad de la microbiota (Torok *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2012; Neelakanta *et al.*, 2013; Bhogaju *et al.*, 2018) y el enfoque metagenómico completo, también denominado megenómica *shotgun*, debido a la aleatoriedad con que se obtienen las secuencias genómicas (Thomas *et al.*, 2012; Sharpton, 2014). La figura 2 muestra una descripción general de ambos tipos de estudio y su combinación.

La metagenómica *shotgun* proporciona datos más completos sobre el potencial funcional presente en las comunidades microbianas. Para este último enfoque, la naturaleza aleatoria de la secuenciación garantiza una cobertura adecuada para evaluar la estructura de la comunidad y abre nuevas vías para descubrir novedades estructurales y funcionales (Kuczynski *et al.*, 2012).

Metagenómica Dirigida 16S RNA

Las subunidades de proteína ribosómica, los factores de elongación, y las subunidades de ARN polimerasa han sido utilizados como genes marcadores para estudiar la composición y la diversidad microbiana, sin embargo, estos representan poblaciones diferentes (Ríos y Ríos, 2011). En consecuencia, la mayoría de estudios de comunidades microbianas incluyen la secuenciación de amplicones dirigidos filogénicamente informativos, como el gen de la subunidad ribosomal 16 rRNA para bacterias y Archaea, el gen 18S rRNA de especies eucarióticas y las regiones nucleares de espaciador transcrito ribosomal (ITS) para hongos (Meyer *et al.*, 2010). Una característica diferenciadora de los genes rARN es su presencia en todos los organismos, mientras que otros marcadores usados tienen una distribución taxonómica limitada (Kuczynski *et al.*, 2012). Además, el gen ribosómico 16S rRNA consta de nueve regiones hipervariables flanqueadas por regiones conservadas, las regiones hipervariables son específicas de cada género y especie, característica utilizada en la identificación de microorganismos (Baker *et al.*, 2003). En consecuencia, el gen 16S rRNA es un marcador molecular óptimo para la identificación a nivel de especie en poblaciones microbianas. Por ejemplo, para estudios microbianos del intestino de aves productoras de carne y huevos se han cubierto las regiones V1-V3,

Tabla 1. Estudios metagenómicos del microbioma de aves de corral.

| Enfoque Metagenómico | Objetivo del estudio | Tipo de Muestra | Tiempo Muestreo | Numero de Muestras | Dieta de los Animales | Extracción ADN | Herramienta Secuenciación | Herramienta Bioinformática | Referencia |
|---|--|------------------|--|------------------------------------|---------------------------|---|---|--|-------------------------|
| 16S rRNA Shotgun | Elucidación de las funciones de la microbiota cecal y caracterización del perfil de la comunidad microbiana. | Ciego intestinal | Día 14 y 28. Un grupo de pollos fue inoculado artificialmente con 10^8 CFU de <i>C. jejuni</i> . | Muestras por agrupamiento | Dieta Comercial Comercial | Protocolo de Yu y Morrison (2004). QIAmpH DNA Stool Mini Kit | Piro secuenciación 454 Lyfe Science. Lecturas: 2-4=30 millones | MG-RAST Algoritmos (BLASTN /BLASTX) | Qu et al., 2008. |
| 16S rRNA | Estudiar el metabolismo de microbios intestinales de aves de corral | Heces | - | 5 Muestras | - | Protocolo de Yu y Morrison (2004). QIAmpH DNA Stool Mini Kit | Pirosecuenciación Roche 454 GS-FLX | MG-RAST RDP, Silva LSU, Silva SSU, Green Gene and SEED | Ahir et al., 2010. |
| Shotgun 16S rRNA Región Hipervariable (V3) | Efectos de los niveles terapéuticos de virginia y tilosina y la monensina coccidial en la composición de bacterias del ciego de pollo. | Ciego intestinal | Día 7, Día 14, Día 35. | Muestras agrupadas por tratamiento | Dieta Modificada | QIAmpH DNA Stool Mini Kit | GS-FLX Lecturas: 1.291.219 Av. longitud: 234-399 pb. | MOTHUR MG-RAST | Danzeisen et al., 2011. |
| Shotgun 16S rRNA Región Hipervariable (V1-V3) | Determinar la correlación entre la microbiota del tracto gastrointestinal y el uso de energía en las aves de corral, asociado con la eficiencia de la conversión de los alimentos. | Ciego intestinal | Día 24 | Muestras agrupadas por tratamiento | Dieta Modificada | Protocolo de Yu y Morrison (2004). | Piro secuenciación 454 Roche 454 FLX Titanium | QIIME | Stanley et al., 2012. |
| 16S rRNA Hipervariable (V1-V3) | Resalta la alta variabilidad de la microbiota del tracto gastrointestinal de pollos. | Ciego intestinal | Día 25 | Muestras agrupadas por tratamiento | Dieta Modificada | Protocolo de Yu y Morrison (2004). | Piro secuenciación 454 Roche 454 FLX Titanium Av. longitud: 300-600 pb. | QIIME | Stanley et al., 2013. |
| 16S rRNA Hipervariable (V3, V4, V1-V3) | Estudiar la estructura de la población de la microbiota intestinal en dos líneas de pollos mantenidos bajo el mismo régimen de cría y alimentación. | Heces | Día 245 | Muestras por agrupamiento | Dieta modificada | QIAmp DNA stool mini kit | Illumina Miseq (6 ciclos) | MG-RAST | Zhao et al., 2013. |
| 16S RNA Shotgun | En este trabajo se analizo la microbiota fecal de Pollos de baja y alta relación de conversión de alimentación (FCR). | Heces | Día 49 | Muestras por agrupamiento | Dieta Comercial | QIAmp DNA stool mini kit | Piro secuenciación 454 Roche 454 FLX Titanium | MG-RAST Base de datos (SEED) | Singh et al., 2014. |
| 16S rRNA Hipervariable (V3, V4, V1-V3) | Cuantificar el efecto de la genética del huésped y la abundancia de microorganismos y la correlación genética de la microbiota intestinal de dos líneas de pollos. | Heces | Día 245 | Muestras por agrupamiento | Dieta modificada | QIAmp DNA stool mini kit | Illumina Miseq (6 ciclos) | MG-RAST | Meng et al., 2014. |
| 16S rRNA Hipervariable (V3, V4) | Caracterización de la microbiota cecal en gallinas ponedoras a lo largo de su vida útil, desde el día de la incubación hasta las 60 semanas de edad. | Ciego intestinal | Semanas 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 19, 22, 26, 34, 38, 45, 51, 55 y 60 | Muestras por agrupamiento | Dieta comercial | QIAmp DNA stool mini kit | Pirosecuenciación GS Titanium | QIIME | Videnska et al., 2014 |

V3-V4, V4-V5, V6-V7, V1, V2, V3, V4, V8, V9 del gen 16S rRNA. (Danzeisen et al., 2011; Stanley et al., 2012; Stanley et al., 2013; Zhao et al., 2013; Meng et al., 2014; Videnska et al., 2014; Sergeant et al., 2014; Ma et al., 2015; Borda-Molina et al., 2016; Hou et al., 2016; Wang et al., 2016; Bortoluzzi et al., 2017; Pineda-Quiroga et al., 2017; Bhogju et al., 2018; Lee et al., 2019), ver tabla 1.

Por otra parte, otra ventaja que proporciona el gen 16S rRNA sobre otros genes marcadores potenciales, es la disponibilidad de varias bases de datos de secuencias de referencia y taxonomía, como greengenes (DeSantis et al., 2006), SILVA (Pruesse et al., 2007) y Ribosomal Database Project1 (Claesson et al., 2010). El gen 16S rRNA ha sido utilizado para análisis filogenéticos de la microbiota cecal en aves de corral (Lan et al., 2002). Sin em-

bargo, el primer estudio de metagenómica dirigida que caracterizó la microbiota gastrointestinal de los pollos se publicó en el año 2008 (Qu et al., 2008). En este estudio, se analizó la microbiota cecal de aves comerciales usando el gen 16S rRNA y metagenómica *shotgun*, utilizando piro secuenciación; los resultados obtenidos revelan una visión más completa de la comunidad microbiana del ciego del pollo. Se encontró que los elementos móviles de ADN son un componente funcional de los microbiomas cecales, lo que contribuye a la transferencia horizontal de genes y la evolución funcional de los microbiomas. Además, esto sugiere que la evolución de metavirus específicos del huésped es un factor que contribuye a la resistencia de la enfermedad a patógenos zoonóticos (tabla 1).

Tabla 1. Estudios metagenómicos del microbioma de aves de corral.

| Enfoque Metagenómico | Objetivo del estudio | Tipo de Muestra | Tiempo Muestreo | Numero de Muestras | Dieta de los Animales | Extracción ADN | Herramienta Secuenciación | Herramienta Bioinformática | Referencia |
|---|---|------------------------------------|--|--|--------------------------------|--|--|--|-----------------------------|
| Shotgun 16S rRNA (Región Hipervariable V1-V3) | Elucidación de las funciones de la microbiota cecal y caracterización del perfil comunitario. | Ciego intestinal | Día 42 | Muestras por agrupamiento | Dieta modificada | Protocolo Sergeant (2012). | Illumina MiSeq2000 Av. Longitud:110 pb | QIIME | Sergeant et al., 2014. |
| Shotgun | Anotación de genes de resistencia a antibióticos del metagenoma de cerdo, pollo y humano y su coexistencia con elementos genéticos asociados. | Heces | 20 días y 80 días | Muestras por agrupamiento (8 Muestras) | Dieta Comercial | Fast DNA Soil kit | Illumina HiSeq 2000 Av. length: 100 pb | CLC Genomics Workbench | Ma et al., 2015. |
| 16S rRNA (Región Hipervariable V3) | Comprender la diferencia en la composición de la comunidad microbiana intestinal, con el fin de proporcionar conocimiento sobre las funciones de la microbiota para el mantenimiento fisiológico del huésped. | Ciego intestinal | Día 7, 14, 21 y 42 | Muestras por agrupamiento | Dieta Comercial | QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) | Illumina Miseq (ejecución pareada de 2 x 151 pb) | MOTHUR Miseq SOP UCHIME PICRUSt PRIMER 6 | Shaafi et al., 2015. |
| 16S rRNA Región Hipervariable V1-2 | Distinguir los efectos del mineral P, Ca y fitasa en la composición de las comunidades microbianas presentes en el contenido y la capa mucosa del tracto gastrointestinal (GIT) de pollos de engorde. | Íleo Ciego intestinal | Día 26 | 237 muestras | Dieta Comercial | Kit Fast DNA™ SPIN. | Illumina MiSeq2000 293,862 ± 1459 secuencias por muestra | MOTHUR | Borda-Mollina et al., 2016. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V4) | Evaluación del desarrollo del microbioma cecal en polluelos desde la eclosión hasta los 28 días de edad con y sin una vacuna viva de Salmonella y / o un suplemento probióticos. | Cecal | Días 0, 1, 3, 7, 14 y 28 | 6 muestras | Dieta Comercial/ Modificada | Kit MO BIO Power Soil | Illumina MiSeq (151 x 151pb) | QIIME | Ballou et al., 2016. |
| Shotgun 16S rRNA Región Hipervariable (V1-V3) | Analizar los metagenomas fecales de los pollos de la línea magra (LL) y grasa (FL) divergentemente seleccionados | Heces | Semana 37 y 40 | 29 Muestras | Dieta comercial | QIAamp DNA stool mini kit | Pirosecuenciación 454 Roche 454 FLX Titanium | QIIME Parallel-META31 and MetaPhlan32 | Hou et al., 2016. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V1-V3) | En este estudio, se investigó el efecto de la reutilización de la cama. Se utilizó 2 regímenes de manejo de la cama: cama fresca versus reutilizada. | Ciego intestinal Cama de corral | Día 10 y Día 35 | Muestras por agrupamiento | Dieta Comercial | Protocolo de Yu y Morrison (2004). | Piro secuenciación 454 Roche 454 FLX Titanium | QIIME | Wang et al., 2016 |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V1-V3) | Estudiar si la microbiota intestinal de gallinas donantes de diferentes edades protegerá igualmente a los pollos contra la infección por <i>Salmonella Enteritidis</i> . | Ciego intestinal | Primer Experimento: Día 4,6 , 7, 8, 11, 13, 16, 20, 23, 26 Día. Segundo Experimento: Día 8. | Muestras por agrupamiento | Dieta comercial | Mini Kit de ADN QIAamp | MiSeq Reagent Kit v3 y MISEQ 2000 | QIIME | Varmuzova et al., 2016. |
| Shotgun 16S rRNA (Región Hipervariable V4) | Comparación de dos líneas de pollos (gordos y magros). Comprender la influencia del huésped en la microbiota intestinal. | Heces | Día 35 | 109 Muestras | Dieta Comercial | QIAamp DNA Stool Mini Kit | Illumina HiSeq2000 Av. longitud: 100 pb | MG-RAST | Ding et al., 2016. |
| Whole genome | Caracterizar los patógenos virales asociados con pollos de engorde no afectados de 2 a 3 semanas de edad que utilizan la secuenciación de próxima generación y metagenómica comparativa. | Ciego intestinal | Día 13 y 21 | Muestras por agrupamiento | - | Protocolo Devaney et al. (2016). Viral RNA mini kit | 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX system | MEGAN MG-RAST | Devaney et al., 2016. |

Como resultado, los perfiles de secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA ha permitido determinar la relación entre la diversidad microbiana y las condiciones ambientales a las que se encuentra expuesta. Además, las modulaciones de la comunidad microbiana en respuesta a los promotores de crecimiento, antibióticos, indicando que los cambios en la estructura de las comunidades microbianas cecales o fecales que han sido inducidas por antibióticos son un factor determinante en la abundancia de microorganismos presentes en el huésped y los retos a futu-

ro para reemplazar los efectos generados por los promotores de crecimiento y antibióticos utilizando enfoques alternativos (Danzeisen et al., 2011; Xiong et al., 2018)

En el caso de la microbiota del tracto gastrointestinal de aves, se ha generado una visión sobre las interacciones huésped-microorganismos, además contempla posibles hipótesis sobre mecanismos de la enfermedad (Ding et al., 2016; Sergeant et al., 2014; Stanley et al., 2013; Wang et al., 2016).

Tabla 1. Estudios metagenómicos del microbioma de aves de corral.

| Enfoque Metagenómico | Objetivo del estudio | Tipo de Muestra | Tiempo Muestreo | Numero de Muestras | Dieta de los Animales | Extracción ADN | Herramienta Secuenciación | Herramienta Bioinformática | Referencia |
|---|--|---------------------------|------------------|--|-----------------------------------|---|--|--|-------------------------|
| 16S rRNA Región Hipervariable (V3) | Caracterizar filogenéticamente el contenido cecal y la mucosa ileal de pollos y pavos utilizando metagenómica. | Ciego intestinal | 6 Semanas | Muestras por agrupamiento | Dieta comercial | Protocolo Yu y Morrison (2004). | 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX system | UCHIME MOTHUR MG-RAST | Wei et al., 2016. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V3-4-5) | Estudio de la composición y estructura de la comunidad microbiana en pollos de engorde y el efecto de la infección por <i>Campylobacter jejuni</i> . | Ciego intestinal y mucosa | 7 y 14 días | Muestras por agrupamiento | Dieta Comercial | Kit Power Soil | Illumina MiSeq | QIIME | Awad et al., 2016. |
| 16S rRNA | Metagenómica Diagnostica en muestras fecales. Identificación de <i>Campylobacter sp.</i> | Heces | - | Muestras por agrupamiento 10 muestras | Dieta Comercial | QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit | Illumina MiSeq 2 x 250 pb | CLARK | Andersen et al., 2017. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V4) | En este estudio, se registraron los rendimientos individuales de 252 gallinas para evaluar la eficiencia de la alimentación. | Heces Ciego intestinal | Semana 59 | Muestras agrupadas | Dieta comercial | QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN, cat#51504)58 | Illumina MiSeq | FLASH QIIME ANOSIM analysis62 | Yan et al., 2017. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V4) | Se utilizó el pollo como organismo modelo para investigar la composición microbiana intestinal en embriones, pollos y gallinas maternas. | Ciego intestinal Heces | Día 4, 12 y 42 | 176 Muestras | Dieta Comercial | DNA Stool Mini Kit (TIANGEN, cat#DP328 | Illumina TruSeq | PICRUSt QIIME STAMP | Ding et al., 2017. |
| 16S rRNA (Región Hipervariable V3-V4) | Evaluación del efecto del butirato de sodio en el rendimiento, la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en microbiota cecal de pollos de engorde cuando se redujo la energía de la dieta. | Ciego intestinal | Día 28 | Muestras por agrupamiento 6 muestras | Dieta modificada | QIAamp DNA Stool Mini Kit | Illumina MiSeq2000 Av. longitud: 300-600 pb | MOTHUR | Bortoluzzi et al., 2017 |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V4) | Caracterizar el microbioma y la carga bacteriana aerobia de los huevos; antes de la desinfección, después de la desinfección. | Huevos | - | 150 Huevos antes de Desinfección 150 Huevos después de desinfección | - | DNeasy Blood & Tissue Kit™ | MiSeq (Illumina) (2 x 301 pb) | Trimomatic v. 0.32 FLASH v. 1.2.7 QIIME MG-RAST | Olsen et al., 2017. |
| Protocolo PGM. | Identificar la microbiota presente en los huevos | Huevos | Diferentes lotes | Muestras por agrupamiento | - | Protocolo Neira et al., 2017. Power Biofilm DNA Isolation Kit | Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies. Protocol Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 for 500 flows. | NCBI GenBank database | Neira et al., 2017. |
| 16S rRNA (Región Hipervariable V3) | Dinámica de la microbiota dentro de los hospedadores. | Ciego intestinal | - | 6 Muestras | Dieta modificada y dieta variable | QIAamp DNA Stool Mini Kit | Illumina MiSeq 855,136 Lecturas | QIIME | Ferrario et al., 2017. |

Adicionalmente, estudios metagenómicos utilizando el gen 16s RNA han asociado el genotipo del hospedador y la dieta como factores influyentes en la sucesión de la microbiota intestinal de las aves de corral. (Zhao et al., 2013; Meng et al., 2014; Borda-Molina et al., 2016; Varmuzova et al., 2016; Ding et al., 2016; Yan et al., 2017; Bortoluzzi et al., 2017; Pineda-Quiroga et al., 2017; Huang et al., 2018).

Metagenómica Shotgun

La metagenómica dirigida es un enfoque que hace posible estudiar la diversidad microbiana a gran escala, no obstante la secuenciación de amplicones tiene sus limitaciones; en primer lugar, puede producir estimaciones de diversi-

dad ampliamente diferentes (Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group, 2012), en segundo lugar, la secuenciación de amplicones generalmente solo proporciona información sobre la composición taxonómica de la comunidad microbiana (Liu et al., 2008). En consecuencia, es imposible resolver directamente las funciones biológicas asociadas a los taxones utilizando este enfoque, además, la identificación de bacterias altamente divergentes son difíciles de caracterizar mediante este enfoque (Sharpton, 2014).

En consecuencia, el enfoque metagenómico "shotgun" es un método alternativo para estudiar ecosistemas

Tabla 1. Estudios metagenómicos del microbioma de aves de corral.

| Enfoque Metagenómico | Objetivo del estudio | Tipo de Muestra | Tiempo Muestreo | Numero de Muestras | Dieta de los Animales | Extracción ADN | Herramienta Secuenciación | Herramienta Bioinformática | Referencia |
|---|--|--|--|------------------------------------|-----------------------|---|--|---------------------------------|------------------------------|
| 16S rRNA (Región Hipervariable V4) | Investigar el efecto de la suplementación de dietas a base de trigo y cebada con suero seco, en polvo, y con quitosán, en el rendimiento productivo, histomorfometría duodenal y microbioma cecal de los pollos. | Ciego intestinal | Día 21 y Día 42 | 10 Muestras | Dieta Modifica | Kit de extracción de ADN Power Soil | Illumina MiSeq2000 | MOTHUR UCHIME | Pineda-Quiroga et al., 2017. |
| Shotgun | Investigar la ocurrencia, diversidad y abundancia de genes de resistencia a antibióticos en heces de pollos de engorde | Heces | 6 semanas en pollos 52 semanas en gallinas ponedoras | Muestras Agrupadas | Dieta comercial | QIAamp DNA Stool Mini Kit | Illumina HiSeq 2000 Lecturas: 4.737.146 | MEGAN BLAST | Tong et al., 2017. |
| 16S rRNA (Región Hipervariable V3-V4) | Investigar los cambios en la comunidad bacteriana, variaciones en los genes de resistencia en pollos de engorde. | Heces | Día 20, 25, 30 y 40 | Muestras agrupadas por tratamiento | Dieta comercial | PowerSoil DNA isolation kit | Illumina HiSeq 4000 150 PE (paired-end sequencing) | ARCS-OAP CLC Genomics Workbench | Xiong et al., 2018. |
| 16S rRNA | Estudio del perfil microbiológico de canales de pollo recolectadas de animales alimentados con diferentes dietas. | Canales | Día 35 | 15 Canales | Dietas modificada | DNeasy Blood & Tissue KitTM | HiScanSQ (Illumina) a 100 pb | MG-RAST STAMP | De Cesare et al., 2018. |
| 16S rRNA | El análisis metagenómico proporciona información sobre el mecanismo de promoción del crecimiento de MCE y la importancia de utilizar promotores de crecimiento | Ciego intestinal | Día 21 y 42 | 495 Muestras | Dieta modificada | Protocolo Zoetendal et al., 2006 | Illumina HiSeq 2500 and HiSeq X10 | DIAMOND KEGG | Huang et al., 2018. |
| 16S rRNA Hipervariable V2-4, V3-6, 7-9 | Establecer y comparar los perfiles microbianos del GIT de gallina y pollo de Guinea y establecer la diversidad o similitud microbiana entre las dos especies de aves. | Ciego intestinal | 20 Semanas | 20 muestras | Dieta modificada | Genomic DNA mini kit (Life Technologies, Waltham, MA, USA) | Ion plus fragment (Life Technologies). | QIIME BLAST | Bhagoju et al., 2018. |
| 16S rRNA (Región Hipervariable V3-V4) | Comparar la composición de la microbiota intestinal en los patos Shaoning en diferentes condiciones de piso de cama. | Ciego intestinal | 300 días | 85 muestras | Dieta comercial | kit QIAamp DNA Stool Mini | Illumina HiSeq Lecturas: 250 pb | FLASH (V1.2.11) QIIME | Wang et al., 2018. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V3-V4) | En este estudio, se estudió la microbiota de huevos líquidos producidos por diferentes proveedores y productos finales (huevos enteros líquidos pasteurizados). | Huevos líquidos | Junio de 2014- Junio de 2015 | Muestras agrupadas(415) | - | Protocolo Perlas Magnéticas. (Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil). | Illumina. V2 kit, 300 ciclos | FASTQC UCHIME2 QIIME UCLUST | Vieira et al., 2019 |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V3-V4) | Comparar la estructura microbiana intestinal de los patos Shaoning con y sin agua. | Cecal | 32 semanas | 10 muestras | Dieta comercial | QIAamp Fast DNA Mini Kits | Illumina (NEB, USA) | QIIME | Zhao et al., 2019. |
| 16S rRNA Región Hipervariable (V2,V3,V4,V6-7,V8,V9) | Caracterizar la comunidad microbiana en el tracto reproductivo de los pollos y determinar el origen de la microbiota intestinal del embrión de pollo. | Oviducto Cáscara de huevo Intestino Clara de huevo | 34 y 23 Semanas | 92 Muestras | Dieta comercial | DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) | Ion S5 XL(chip Ion 530) | QIIME2 ANCOM | Lee et al., 2019. |

complejos, en el cual se reducen las limitaciones anteriormente mencionadas. En este procedimiento, el ADN extraído se corta en pequeños fragmentos que se secuencian de forma independiente, en lugar de apuntar a un locus genómico específico para la amplificación, dando como resultado una vista completa de todos los microorganismos y genes presentes en la microbiota

(Sharpton, 2014). De esta forma, la metagenómica "shotgun" describe el conjunto de genomas y los genes correspondientes de un ecosistema dado, facilitando la caracterización de la funcionalidad bacteriana potencial en ambientes específicos (Marchesi y Ravel, 2015). Asimismo, la combinación del uso de marcadores filogenéticos 16S rRNA, enfoques metagenómicos *shotgun*,

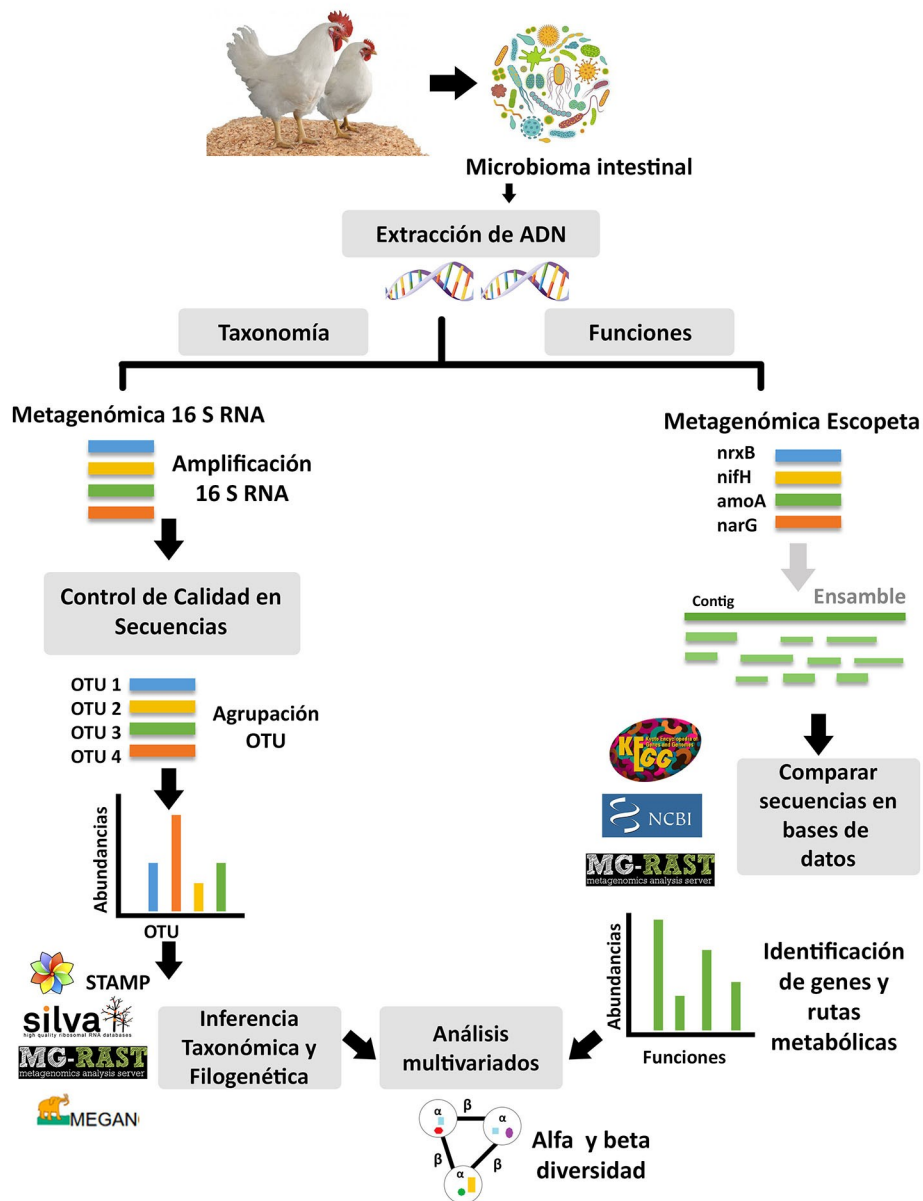


Figura 2. Análisis metagenómico del tracto gastrointestinal de aves. Adaptado de Morgan *et al.* (2013), Choi *et al.* (2015).

técnicas moleculares de secuenciación masiva y las herramientas para análisis de datos, han permitido obtener información sobre el microbioma gastrointestinal de aves de corral, en cuanto a taxonomía y función de microorganismos (Borda-Molina *et al.*, 2016; Bortoluzzi *et al.*, 2017; Danzeisen *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2014; Pineda-Quiroga *et al.*, 2017; Sergeant *et al.*, 2014; Stanley *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). No obstante, hasta el momento solo unos pocos estudios se han enfocado en estudiar las funciones de los microorganismos que se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal de las aves (Yeoman *et al.*, 2012). Hasta la

fecha se han realizado ocho estudios metagenómicos *shotgun* en pollos, enfocados en el ciego intestinal. El primero, realizado por Qu *et al.* (2008), se determinó la distribución de 200.000 genes presentes en los pollos sanos y en pollos infectados experimentalmente con *Campylobacter jenuini*. En el segundo, Danzeisen *et al.* (2011), analizaron las diferencias en los genes entre los pollos de control y los alimentados con niveles subterapéuticos de antibióticos para mejorar el crecimiento. En el tercero, Singh *et al.* (2014), determinaron la variación de la microbiota intestinal y la eficiencia de la conversión de los alimentos representado en ganancia de

peso, encontrando que la microbiota cecal presentó una mayor diversidad en muestras con alta conversión de alimento comparada con la microbiota encontrada en aves con baja conversión de alimento. Por otra parte, las diferencias encontradas en el análisis funcional de los genes asociados con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos o asociados a la virulencia y motilidad flagelar, estaban en mayor proporción en aves con baja conversión de alimento. En este sentido, esta información facilita estrategias para mejorar la eficiencia de la alimentación y la formulación para pollos de engorde.

En el cuarto estudio Sergeant *et al.* (2014), se centraron en las funciones de ciego intestinal encontrando que el microbioma cecal codifica varias fermentaciones o rutas que conducen a la producción de ácidos grasos de cadena corta con características novedosas. En el quinto, Ma *et al.* (2015), investigaron genes de resistencia a los antibióticos (ARG) y su coexistencia con elementos genéticos móviles asociados, detectando altos niveles de genes de resistencia a múltiples medicamentos ARGs (7762 ×/Gb) como tetraciclina, eritromicina y a los aminogluucósidos en las heces de pollos adultos. Estos resultados proporcionan conocimiento con respecto a los genes asociados ARG y la posible evaluación del riesgo ambiental y público. En otro estudio, realizado en la investigación de genes de resistencia a los antibióticos, Tong *et al.* (2017), encontraron que la especie *Escherichia coli* fue representativa en las heces de las aves. Por otra parte el análisis de Blast y la comparación con la base de datos de genes de resistencia a antibióticos reveló que las heces de pollo contenían gran abundancia de genes de resistencia a antibióticos ARG, entre los cuales la vancomicina (*van*) fue más abundante (36% de todas las lecturas). Finalmente, el enfoque Metagenómico *shotgun* ha permitido comparar el microbioma intestinal de dos líneas de pollos (Magras y grasa), observando diferencias estructurales significativas tanto en los metagenomas filogenéticos como en los funcionales entre las dos líneas de pollos (Hou *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016).

En este sentido, los proyectos metagenómicos del tracto gastrointestinal de pollos se han centrado en las funciones de la microbiota cecal (Sergeant *et al.*, 2014), el papel fundamental de la microbiota de aves en los parámetros de rendimiento y cambios en la dieta (Yan *et al.*, 2017), las comparaciones entre líneas gordas y magras (Singh *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2016), los mecanismos de respuesta a microorganismos patógenos (Qu *et al.*, 2008), representación del viruloma (Qu *et al.*, 2008) y de los genes de resistencia a antibióticos (Ma *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2017), ver tabla 1.

Del mismo modo, estas investigaciones descubrieron una gran cantidad de información relacionada con la

prevalencia de elementos móviles y genes involucrados en la nutrición, la virulencia y la resistencia a los antibióticos. Por otra parte, generaron una visión detallada de la diversidad y distribución de todos los tipos de microorganismos, incluidas las bacterias, las arqueas, los virus y los microorganismos eucarióticos.

Tecnologías de Secuenciación de microbiomas de aves de corral

Se han utilizado varias tecnologías de secuenciación para realizar estudios de microbioma a partir de perfiles taxonómicos basados en 16s RNA y *shotgun* (Danzeisen *et al.*, 2011). Dentro de estas tecnologías se encuentra incluida la secuenciación capilar (Sanger), este método pertenece a la primera generación de técnicas de secuenciación. Lu *et al.* (2003), utilizaron esta técnica para estudiar la sucesión de la microbiota intestinal de pollo, encontrando que la composición y la diversidad de la microbiota varía con diferentes dietas, aditivos para piensos y probióticos (Ballou *et al.*, 2016). Pese a los resultados encontrados, el método convencional de secuenciación de Sanger ha limitado los estudios metagenómicos de microbiota gastrointestinal debido a los altos costos de secuenciación, insuficiencia en las secuencias y su bajo rendimiento (Choi *et al.*, 2015). En consecuencia, hubo la necesidad abordar nuevos métodos de alto rendimiento, capaces de generar cientos de miles de secuencias de manera más rápida y económica. Estas técnicas son denominadas tecnologías de secuenciación de próxima generación (Metzker, 2010), las cuales constituyen diversas estrategias que se basan en una combinación de plantillas, secuenciación e imágenes, alineación del genoma y métodos de ensamblaje (Diaz-Sanchez *et al.*, 2013). Actualmente, existen diferentes plataformas disponibles para secuenciación; dentro de éstas, se incluyen plataformas de segunda generación HT-NGS, las cuales pueden generar alrededor de quinientos millones de bases de secuencia en bruto (Roche) a miles de millones de bases en una sola ejecución (Illumina, SOLiD). Estos nuevos métodos tienen algunas de las siguientes características en la forma de realizar la secuenciación:

- (i) Secuenciación por síntesis:
 - PCR en emulsión (Roche SoliD)
 - PCR en puente (Illumina)
- (ii) Secuenciación por semiconducción:
 - Ion Torrent

En la tabla 2 se señalan características distintivas de cada tecnología, como longitud de lectura, tiempo de corrida, tasa de error, tamaño de inserción y costo.

La descripción de cada una de las plataformas mencionadas permite evidenciar los rápidos avances tecnológi-

Tabla 2. Comparación de plataformas de secuenciación de próxima generación. (Segunda y tercera generación)

| Plataforma | Roche/454 ^s CS FLX, Titanium | Illumina, Solexa | | | SOLID | Heliscope | Pacific Biosciences | Ion Torrent |
|-------------------------------------|---|---|-------------------|---------|--|--|---|---|
| | | Illumina G.Alix | HiSeq2000 | MiSeq | | | | |
| Librería /Preparación del ADN molde | Emulsión PCR | Fase Sólida | | | Emulsión PCR | Moléculas sencillas | Moléculas sencillas | Chip-Semiconductor |
| Química NGS | Pirosecuenciación | Terminador reversible | | | Secuenciación por ligadura | Terminador reversible | Tiempo Real | Información química y digital |
| Longitud de lectura (bases) | 300-400b | 76-101b | 101-151b | 36-151b | 50b | 32 ^b | 1100b | 200b |
| Tamaño Máximo de inserto | 800b | 500b | 500b | 500b | NA | NA | >1Kb | 400b |
| Tiempo de corrida | 9 h | 6-9 d | 9-15 d | 4-27 h | 7-14 d | 8 d | 1.5h | 2-3 h |
| Lecturas por corrida | 106 | 4x10 ⁶ | 3x10 ⁶ | 107 | NA | NA | 3.5 x10 ⁷ | 103 |
| Tasa de Error % | 0,001 | <1 | | | NA | NA | 15 | 2 |
| Ventajas | Las lecturas más largas mejoran el mapeo en regiones repetitivas; tiempos de ejecución rápidos. | Actualmente la plataforma más utilizada en el campo | | | La codificación de dos bases proporciona una corrección de errores inherente | Secuenciación de ADN de una sola molécula es su potencial para leer secuencias extremadamente largas; es capaz de secuenciar más de 28 C/B | Potencial para lecturas que exceden de 1 kb. | Secuenciación del genoma microbiano transcriptoma |
| Desventajas | Alto costo del reactivo; Altas tasas de error en repeticiones de homopolímeros. | Baja capacidad multiplexora de muestras | | | Tiempos de ejecución largos | Altas tasas de error en comparación con otras terminaciones químicas reversibles | Altas tasas de error comparado con otras tecnologías | Plataforma no adecuada para detección de mutaciones |
| Aplicaciones Biológicas | Encamblajes de novo de genoma bacteriano captura de exoma de escala media; Amplicón 16S RNA | Descubrimientos Genéticos en metagenómica | | | Descubrimientos Genéticos en Metagenómica | Métodos basados en Secuencias | Secuenciación transcriptoma de longitud completa; complementa otros esfuerzos de re-secuenciación | Secuenciación de microbiomas |
| Costo | \$8439 USD | \$8950 USD | | | \$17447 USD | <NCS | <NCS | - |
| Referencias | Kuczynski et al., 2012; Metzker et al., 2010; Diaz-Sanchez et al., 2013; Pareek et al., 2011. | | | | | | | |

cos en las metodologías de secuenciación, sus aplicaciones y las herramientas optimizadas resaltan la importancia de la investigación del genoma. Por otra parte, se hace evidente que en los últimos años los estudios sobre la evolución experimental microbiana han utilizado la secuenciación como una herramienta fundamental para investigar el rol ecológico de los microorganismos en diferentes ambientes (Kuczynski *et al.*, 2012).

Por otra parte, la aplicación de las técnicas de secuenciación de próxima generación son herramientas útiles y valiosas para comprender la evolución de microorganismos patógenos y sus cambios mutacionales dentro y en el huésped, además, son idóneas para identificar los microorganismos patógenos que causan infecciones o epidemias en las poblaciones huéspedes (Schmid *et al.*, 2000).

Lo anterior evidencia como la secuenciación de próxima generación revolucionó y cambió las perspectivas en la caracterización de las comunidades microbianas. Los estudios metagenómicos realizados en microbioma de aves de corral demuestran que las tecnologías de secuenciación seleccionadas para este tipo de investigaciones han sido las tecnologías: Illumina MiSeq, HiSeq, Pirosecuenciación e Ion Torrent (tabla 1).

De este modo, las tecnologías de secuenciación de próxima generación en investigaciones del microbioma de aves de corral muestran una nueva orientación e integración de los antiguos estudios de laboratorio, resaltando su veracidad en el seguimiento y detección de los patrones de evolución encontrados en microorganismos patógenos en diferentes entornos (Danzeisen *et al.*, 2011). Además, estas tecnologías soportan el desarrollo de estrategias para el control de patógenos, puesto que permite identificar genes de resistencia, diversidad microbiana a gran escala, generando como resultado un análisis completo del microbioma intestinal (Qu *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019).

Herramientas de análisis de datos bioinformáticos

Después de obtener las secuencias de ADN, éstas deben ser analizadas e interpretadas. Es primordial analizar los datos obtenidos para determinar las identidades y los roles de las especies microbianas presentes en las muestras analizadas (Ounit *et al.*, 2015). La gran cantidad de datos producidos en los proyectos metagenómicos requiere de herramientas bioinformáticas para su análisis dado que la manipulación directa de datos, como la alineación manual de secuencias de ADN es dispendiosa y demanda mucho tiempo (Kuczynski *et al.*, 2012). Por ejemplo, el ensamblaje de los datos de las secuencias y la identificación de unidades taxonómicas operativas (OTU), es uno de los principales retos técnicos para

las herramientas de análisis metagenómico (Behnam y Smith, 2014). Por otra parte, además de la alta complejidad de los datos metagenómicos, es crítico y difícil analizar los mismos utilizando herramientas independientes. Existen diferentes herramientas para clasificar lecturas metagenómicas contra conjuntos de datos de referencia (Mandal *et al.*, 2015). Aquí revisamos algunas herramientas software, útiles para el análisis de los datos de secuenciación del gen del marcador 16S rRNA y los datos de metagenómicos *shotgun* (tabla 3).

En esta revisión se describen diferentes enfoques bioinformáticos con el fin de soportar la información principal para la selección y aplicación idónea de los mismos en los análisis de datos metagenómicos. Para ello, se han usado diferentes softwares para la eliminación de secuencias de baja calidad y verificación de secuencias quiméricas (Haas *et al.*, 2011), eliminación de errores generados en la secuenciación, producción de un grupo de secuencias casi idénticas denominadas unidades taxonómicas operativas y el análisis estadístico para determinar las diferencias significativas comparadas con la secuencia de referencia (Caporaso *et al.*, 2010), ver figura 3.

De acuerdo con Medinger *et al.* (2010), las unidades taxonómicas operativas (OTU) están definidas por dos enfoques:

i) La agrupación no supervisada en la similitud de secuencia, ii) la agrupación supervisada que asigna directamente secuencias a grupos taxonómicos.

De esta manera, las unidades taxonómicas operativas (OTU) representan la información taxonómica y proporcionan información sobre la diversidad de la población. Posteriormente a la asignación taxonómica, se procede a realizar el análisis estadístico para establecer diferencias significativas comparadas con la secuencia de referencia (Videnska *et al.*, 2014).

El análisis estadístico contiene el estudio de la biodiversidad direccionada a dos indicadores relevantes: diversidad alfa y beta (Choi *et al.*, 2015). La riqueza y uniformidad de las especies individuales en una muestra es denominada diversidad alfa (Hughes, *et al.*, 2001), mientras que la diversidad beta permite comparar múltiples comunidades con el fin de identificar OTU o taxones compartidos entre las mismas y relacionarnos con la metadata (Colwell, 2009). Así mismo, tanto la riqueza como la uniformidad de las especies son indicadores importantes de la salud de los animales. Por ejemplo, en los estudios realizados por Danzeisen *et al.* (2011), Borda-Molina *et al.* (2016), Pineda-Quiroga *et al.* (2017) y Bortulozi *et al.* (2017), se identificó que el número de microorganismos

Tabla 3. Comparación de herramientas informáticas para análisis metagenómicos.

| Herramienta | Web Link | Plataforma | Características Principales | Herramientas Incorporadas | Métodos de Agrupamiento | Soporte | Datos de Almacenamiento | Referencias |
|---------------|---|-----------------------|---|--|---|---|--|--|
| QIIME | http://www.qiime.org | Versión independiente | Análisis de redes, histogramas de dentro o entre muestras. Diversidad | ND | Árbol Filogenético Mapa de Calor, Gráfico de Barras | Ayuda en Línea Manual | No almacena | Mandal et al., 2015; Caporaso et al., 2010. |
| MOTHUR | http://www.mothur.org/ | Versión independiente | Procesamiento rápido de grandes datos de secuencia | ARB, DOTUR, SONS, IBSHUFF, UniFrac, MOVA, HOMOVA, TreeClimber | Dendograma, Árbol Filogenético, Diagrama de Veen, Mapa de Calor | Ejemplos en Línea, tutoriales | No almacena | Schloss et al., 2009; Mandal et al., 2015. |
| RAMMCP | http://weizhonglab.ucsd.edu/rammcap/cgi-bin/rammcap.cgi | Versión Independiente | Agrupación de secuencias ultrarrápida y anotación de la familia de proteínas | Pfam, Tigrfam, RPS-BLAST | Gráficos de Barras, Árbol Filogenético | Ejemplo y tutoriales | No almacena | Mandal et al., 2015; Li, 2009. |
| MC-RAST | https://metagenomics.anl.gov/ | Servidor Web | Canalización de alto rendimiento para el análisis metagenómico funcional. | SEED subsystem, COG, KO, NOG, eggNOG, 5RNA, KEGG, TrEMBL, SEED, PATRIC, SwissProt, GenBank, RefSeq | Mapa de Calor, Árbol Filogenético Gráfico de Barras, Tabulación | Blog y Manual | 215773 conjunto de datos de metagenomas y 30589 metagenomas publicados | Dudhagara et al., 2015; Oulas et al., 2015; Mandal et al., 2015. |
| IMG/M | http://img.jgi.doe.gov/m | Servidor Web | Realiza análisis de composición filogenética, funcional o metabólica potencial dentro de microbiomas individuales y comparaciones entre microbiomas | COG, KOG, KEGG, KO, Pfam, TIGRFam, TIRGIR, MetaCyr, ClO | Tabulación, Gráfico Circular Árbol Filogenético, Gráfico de Reclutamiento, Mapa de Calor | Guías, Procedimiento Estándar | 32802 genomas y 5234 conjunto de datos | Dudhagara et al., 2015; Mandal et al., 2015. |
| METAREP | http://jcv.org/metarep/ | Servidor Web | Marco flexible de metagenómica comparativa | COG, NCBI, Taxonomy | Tabulación, Mapa de Calor Gráfico de Agrupamiento Jerárquico | Manual y videos | No almacena | Dudhagara et al., 2015; Mandal et al., 2015. |
| CoMet | http://comet.gobics.de/ | Servidor Web | Hallazgo de ORF y subsiguiente asignación de dominio Pfam a proteína Secuencias | Pfam, ClO | Tabulación, Dendograma Gráfico de Barras Matriz de Distancias | Ayuda en Línea | No almacena | Dudhagara et al., 2015; Lingner et al., 2011. |
| METAGENassist | http://www.metagenassist.ca/METAGENassist/ | Servidor Web | Realiza análisis estadísticos multivariados exhaustivos sobre la Datos de diferentes sitios de host y entorno. | BacMap, GOLD, NCBI Taxonomy, PubMed | Dendograma, Mapa de Calor K-means, Mapa de Auto organización | Ejemplos de la herramienta y Tutoriales | No almacena | Dudhagara et al. 2015; Arndt et al., 2012. |

Tabla 3. Comparación de herramientas informáticas para análisis metagenómicos.

| Herramienta | Web Link | Plataforma | Características Principales | Herramientas Incorporadas | Métodos de Agrupamiento | Soporte | Datos de Almacenamiento | Referencias |
|--------------------|---|--------------|--|---|--|---|--|--|
| MetaABC | http://metaabc.iis.sinica.edu.tw/ | Servidor Web | Filtración de datos y las técnicas de normalización para mejorar la asignación taxonómica en el análisis metagenómico | Database of reference genomes (NCBI) | Mapa de Calor, Gráfico de Barras, Gráfico Circular | Ayuda en línea | 52 Conjunto de Datos | Dudhagara et al., 2015; Su et al., 2011. |
| MyTaxa | http://enve-omics.ce.gatech.edu/mytaxa/ | Servidor Web | Asignación taxonómica de secuencias metagenómicas con alta precisión | Database of reference genes and genomes (NCBI) | Árbol Filogenético, Gráfico de Barras | Ejemplos de la Herramienta | No almacena | Dudhagara et al., 2015; Luo et al., 2014. |
| metaMicrobesOnline | http://meta.microbesonline.org | Servidor Web | Estudio filogenético de genes de genomas microbianos y metagenomas. | TIGRfam, COG, Pfam | Tabulación, Árbol Filogenético | Guías, tutoriales, ayuda a través de correo | 155 Metagenomas y 3 527 conjunto de datos de genomas | Dudhagara et al., 2015; Chivian et al., 2012. |
| EBI Metagenomics | https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/ | Servidor Web | Análisis metagenómico taxonómico, funcional y comparativo. | RDP, Greengenes, database, InterPro protein signature data base | Tabulación, Gráfico Circular, Gráfico de Barras, Mapa de Calor, Columna apilada, Análisis de Componentes Principales | Entrenamiento, Soporte en línea, por correo y Twitter | 141 proyectos y 5800 conjunto de datos | Dudhagara et al., 2015; Hunter et al., 2013. |
| CAMERA | http://camera.calit2.net/ | Servidor Web | Proporciona una lista de flujos de trabajo para el análisis de datos WCS | FragGeneScan, MetaGene, COG, Pfam, TIGRfam, CO, KEGG | Tabulación, Gráfico Circular, Dendograma | Tutoriales, videos, manual en línea | 128 proyectos y 2660 muestras | Dudhagara et al., 2015; Seshadri et al., 2006. |
| META VIR | http://metavir-meb.univbpclermont.fr/ | Servidor Web | Anotación de secuencias metagenómicas virales en bruto y ensambladas. | Pfam, RefSeq virus database | Mapa de Calor, Dendograma, Gráfico de Reclutamiento, Gráfico Circular | Videos Tutoriales, guías, contacto en línea. | 170 conjunto de datos de metagenomas virales y 335 proyectos | Dudhagara et al., 2015; Roux et al., 2014 |
| VIROME | http://virome.dbi.udel.edu/ | Servidor Web | Análisis de datos metagenómicos recopilados de ensamblajes virales que se producen en diferentes contextos ambientales | SEED, ACLAME, COG, CO, KEGG, MGOL, UniRef 100 | Tabulación, Gráfico Circular, Datos de Tabulación Delimitado | Videos Tutoriales | 466 librerías que contienen 24386816 lecturas | Dudhagara et al., 2015; Wommack et al., 2012. |

en el intestino del huésped disminuye durante el tratamiento con antibióticos o variaciones en los nutrientes de la dieta suministrada. Así por ejemplo, herramientas bioinformáticas tales como MOTHUR y QIIME, las cuales permiten el cálculo de varios índices, incluidos Chao,

son estimadores de cobertura basados en abundancia. Adicionalmente, los índices Shannon y Simpson calculan la abundancia o distribución de las unidades taxonómicas dentro de una población particular (Caporaso et al., 2010; Schloss et al., 2009).

Por otra parte, algunos estudios sugieren que la microbiota intestinal con una alta diversidad alfa está fuertemente correlacionada con funciones genéticas específicas, concluyendo que el huésped que presenta una alta diversidad en el tracto gastrointestinal puede ser más estable o más saludable que aquellos que tienen una baja diversidad (Caporaso *et al.*, 2010). De esta manera, los resultados proporcionados por MOTHUR y QIIME, representados en tablas o como curvas de rarefacción, permiten la comparación de las comunidades microbianas y soportan la emisión de conclusiones basadas en la diversidad alfa y su contribución en la inferencia funcional de la microbiota estudiada (Hughes *et al.*, 2001). A pesar de la información detallada que se puede obtener mediante el procesamiento y predicción funcional realizada con las herramientas bioinformáticas, se recomienda ser prudente al emitir conclusiones sólidas dado que existen un gran número de unidades taxonómicas operativas (OTU) que no se pueden asignar a un género o familia específica (Lee *et al.*, 2019).

Finalmente es importante mencionar que las herramientas más utilizadas para el análisis de datos metagenómicos asociados al microbioma de aves de corral han sido MG-RAST, QIIME y MOTHUR (tabla 3). Estas han permitido definir grupos funcionales y taxones bacterianos importantes en las diferentes investigaciones. En el estudio realizado por Danzeisen *et al.* (2011), se identificaron unidades taxonómicas operativas OTU exclusivas de los grupos de tratamiento con monensina, virginamicina y tilosina. Estas incluyen los géneros *Anaerotruncus sp*, *Subdoligranulum sp* y *Sedimentibacter sp*. De acuerdo a la literatura este tipo de microorganismos ha sido asociado con la promoción del crecimiento y la salud microbiana y podrían ser utilizados como marcadores moleculares de un estado intestinal saludable. De igual manera, en la investigación realizada por Ma *et al.* (2015), el ensamblaje de metagenomas combinado con el análisis de anotación taxonómica ejecutado en MEGAN y el análisis funcional utilizando KEEG; pudo evidenciar un nivel significativamente alto de genes de resistencia a la tetraciclina, eritromicina y aminoglucósidos (macA-macB y tetA-tetR), en las heces de aves adultas comparado con las muestras fecales de humanos y cerdos. Por otra parte se determinó la presencia de elementos móviles (aadA5, dfrA17) en heces fecales de pollos y en microorganismos patógenos humanos. Estos resultados indican la relación entre diferentes genes de resistencia antibióticos encontrados en una variedad de entornos y huéspedes.

Adicionalmente, Xiong *et al.* (2018), determinaron la abundancia de los genes de resistencia a antibióticos usando ARGs-OAP: herramienta en línea para la detección de genes de resistencia a antibióticos a partir de

datos metagenómicos. El análisis bioinformático facilitó la comprensión de cambios en la sucesión de la microbiota cecal de pollos y las variaciones en los genes de resistencia antibióticos cuando el huésped es tratado con niveles bajos y terapéuticos de clortetraciclina. Por ejemplo se encontró una disminución de genes a la tetraciclina (tetA y tetW) y la inhibición de genes resistentes a múltiples medicamentos (mdtA, mdtC, mdtK, ompR) con la dosis terapéutica de tetraciclina. Estos hallazgos son fundamentales en la optimización de los esquemas terapéuticos para microorganismos patógenos presentes en aves de corral y soporte para abordar estrategias terapéuticas alternativas a los mismos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Fortalecer el conocimiento sobre el microbioma de aves de corral mediante estudios metagenómicos facilita comprender y obtener información detallada sobre la dinámica de las comunidades microbianas y rol de estas en el metabolismo y el estado de salud y bienestar de las aves.

Es importante mencionar que los estudios realizados se enfocan principalmente en identificar el perfil de las poblaciones bacterianas presentes, lo anterior puede estar influido por la enorme diversificación de cada sección del tracto gastrointestinal. Además de las variaciones y desviaciones con respecto a los métodos utilizados para la extracción de ADN, la selección de las regiones hipervariables del gen 16S y la caracterización en general dificultan la comparación de las investigaciones realizadas lo cual conduce a resultados no comparables. En consecuencia, los resultados obtenidos de la identificación de comunidades bacterianas asociadas a diferentes estrategias de alimentación y a la influencia de microorganismos patógenos no pueden ser en su totalidad concluyentes por las diferencias y desviaciones encontradas en los experimentos.

Por lo tanto, para incentivar las investigaciones de la microbiota del tracto gastrointestinal, se debe incluir un método estandarizado, con características similares a las establecidas en el protocolo de investigación del microbioma humano. De esta manera, el estudio de la microbiota del tracto gastrointestinal de aves de corral facilitaría la comprensión de las funciones y del papel de los microorganismos en la mediación del crecimiento del huésped bajo diversas condiciones ambientales, como variación en los nutrientes, exposición a patógenos, estrés, entre otros. Con la información obtenida se puede implementar y optimizar la productividad y calidad del huésped teniendo presente que es una de las fuentes principales de proteína del ser humano.

Por otra parte, el uso de secuenciación de próxima generación en estudios metagenómicos en aves de corral

proporciona un análisis a gran escala de la biodiversidad y abundancia de microorganismos. Facilitando un análisis completo y complejo de las comunidades microbianas es posible acceder a información en un único análisis sobre la presencia, cantidad, tipo, virulencia, predicción de roles nutricionales y resistencia a antibióticos de un determinado grupo de microorganismos. Por otra parte, este nuevo enfoque metagenómico ha permitido el desarrollo de análisis genómicos funcionales completos para delinear los requisitos genéticos requeridos para la colonización, infección y supervivencia de microorganismos patógenos en condiciones ambientales a las que este se encuentra expuesto. El desarrollo y la aplicación de tales herramientas novedosas de la metagenómica funcional pueden revelar vulnerabilidades desconocidas previamente, las cuales pueden explorarse para desarrollar nuevas intervenciones y romper la cadena de transmisión de microorganismos patógenos en la industria avícola.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la financiación del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias). Marcela Mantilla fue apoyada mediante la beca de formación de doctorado N°771 de Colciencias.

REFERENCIAS

- Ahir, V. B., Koringa, P. G., Bhatt, V. D., Ramani, U. V., Tripathi, A. K., Singh, K. M., Dhagat, U. M., Patel, J. S., Patel, M. M., Katudia, K. H., Sajjani, M. R., Jakhesara, S. J., & Joshi, C. G. (2010). Metagenomic analysis of poultry gut microbes. *Indian Journal of Poultry Science*, 45(2), 111.
- Amerah, A. M., Péron, A., Zaefarian, F., & Ravindran, V. (2011). Influence of whole wheat inclusion and a blend of essential oils on the performance, nutrient utilisation, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British poultry science*, 52(1), 124-132. <https://doi.org/10.1080/00071668.2010.548791>.
- Andersen, S. C., Kiil, K., Harder, C. B., Josefsen, M. H., Persson, S., Nielsen, E. M., & Hoorfar, J. (2017). Towards diagnostic metagenomics of *Campylobacter* in fecal samples. *BMC microbiology*, 17(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1041-3>.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., & Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60(2), 223-232. <https://doi.org/10.1079/WPS20041>.
- Arndt, D., Xia, J., Liu, Y., Zhou, Y., Guo, A. C., Cruz, J. A., Sinelnikov, I., Budwill, K., Nesbo, C., & Wishart, D. S. (2012). METAGENassist: a comprehensive web server for comparative metagenomics. *Nucleic acids research*, 40(W1), W88-W95. <https://doi.org/10.1093/nar/gks49>.
- Awad, W. A., Mann, E., Dzieciol, M., Hess, C., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., & Hess, M. (2016). Age-related differences in the luminal and mucosa-associated gut microbiome of broiler chickens and shifts associated with *Campylobacter jejuni* infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 154. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.0015>.
- 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, 2. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00002>.
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>.
- Barnes, E. M., Mead, G. C., Barnum, D. A., & Harry, E. G. (1972). The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *British poultry science*, 13(3), 311-326. <https://doi.org/10.1080/00071667208415953>.
- Behnam, E., & Smith, A. D. (2014). The Amordad database engine for metagenomics. *Bioinformatics*, 30(20), 2949-2955. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu405>.
- Borda-Molina, D., Vital, M., Sommerfeld, V., Rodenhutscord, M., & Camarinha-Silva, A. (2016). Insights into broilers' gut microbiota fed with phosphorus, calcium, and phytase supplemented diets. *Frontiers in microbiology*, 7, 2033. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02033>.
- Bortoluzzi, C., Pedroso, A. A., Mallo, J. J., Puyalto, M., Kim, W. K., & Applegate, T. J. (2017). Sodium butyrate improved performance while modulating the cecal microbiota and regulating the expression of intestinal immune-related genes of broiler chickens. *Poultry science*, 96(11), 3981-3993. <https://doi.org/10.3382/ps/pex218>.
- Burbach, K., Seifert, J., Pieper, D. H., & Camarinha-Silva, A. (2016). Evaluation of DNA extraction kits and phylogenetic diversity of the porcine gastrointestinal tract based on Illumina sequencing of two hypervariable regions. *Microbiologyopen*, 5(1), 70-82. <https://doi.org/10.1002/mbo3.312>.
- Bhagoju, S., Nahashon, S., Wang, X., Darris, C., & Kilonzo-Nthenge, A. (2018). A comparative analysis of microbial profile of Guinea fowl and chicken using metagenomic approach. *PLoS one*, 13(3), e0191029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191029>.

- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E., Fierer, N., Gonzalez, A., Goodrich, J., Gordon, J., Huttley, G., Kelley, S., Knights, Dan., Koenig, J., Ley, R., Lozupone, C., MacDonald, D., Muegge, B., Pirrung, Meg., Reeder, J., Sevinsky, J., Turnbaugh, P., Walter, W., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.30>.
- Chivian, D., Dehal, P. S., Keller, K., & Arkin, A. P. (2012). MetaMicrobesOnline: phylogenomic analysis of microbial communities. *Nucleic acids research*, 41(D1), D648-D654. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1202>.
- 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. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(9), 1217. doi: 10.5713/ajas.15.0026.
- Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., & O'Toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research*, 38(22), e200-e200. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq873>.
- Colwell, R. K. (2009). Biodiversity: concepts, patterns, and measurement. *The Princeton guide to ecology*, 257-263.
- Danzeisen, J. L., Kim, H. B., Isaacson, R. E., Tu, Z. J., & Johnson, T. J. (2011). Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS one*, 6(11), e27949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027949>.
- Davies, R. H., & Wales, A. D. (2010). Investigations into Salmonella contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1430-1440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04767.x>.
- 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). doi: 10.4081/ijfs.2018.6923.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 5069-5072. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.
- Devaney, R., Trudgett, J., Trudgett, A., Meharg, C., & Smyth, V. (2016). A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting-stunting syndrome and from normal birds. *Avian Pathology*, 45(6), 616-629. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1193123>.
- Diaz-Sanchez, S., Hanning, I., Pendleton, S., & D'Souza, D. (2013). Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety. *Poultry science*, 92(2), 562-572. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02741>.
- Ding, J., Zhao, L., Wang, L., Zhao, W., Zhai, Z., Leng, L., Wang, Y., He, C., Zhang, Y., Zhang, H., Li, H., & Meng, H. (2016). Divergent selection-induced obesity alters the composition and functional pathways of chicken gut microbiota. *Genetics Selection Evolution*, 48(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0270-5>.
- Ding, J., Dai, R., Yang, L., He, C., Xu, K., Liu, S., Zhao, W., Xiao, L., Luo, L., Zhag, Y., & Meng, H. (2017). Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens. *Frontiers in microbiology*, 8, 1967. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01967>.
- Donaldson, E. E., Stanley, D., Hughes, R. J., & Moore, R. J. (2017). The time-course of broiler intestinal microbiota development after administration of cecal contents to incubating eggs. *PeerJ*, 5, e3587. DOI: 10.7717/peerj.3587/supp-1.
- Dudhagara, P., Bhavsar, S., Bhagat, C., Ghelani, A., Bhatt, S., & Patel, R. (2015). Web resources for metagenomics studies. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.10.003>.
- Eriksson, P., Mourkas, E., González-Acuna, D., Olsen, B., & Ellström, P. (2017). Evaluation and optimization of microbial DNA extraction from fecal samples of wild Antarctic bird species. *Infection Ecology & Epidemiology*, 7(1), 1386536. <https://doi.org/10.1080/20008686.2017.1386536>.
- Ferrario, C., Alessandri, G., Mancabelli, L., Gering, E., Mangifesta, M., Milani, C., Lugli, G., Viappiani, A., Duranti, S., Turrioni, F., Ossiprandi, M., Hiyashi, R., Mackie, R., Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Untangling the cecal microbiota of feral chickens by culturomic and metagenomic analyses. *Environmental microbiology*, 19(11), 4771-4783. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13943>.
- Gaskins, H. R., Collier, C. T., & Anderson, D. B. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology*, 13(1), 29-42. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005768>.
- Gill, F. B. (2014). Species taxonomy of birds: which null hypothesis? *The Auk: Ornithological Advances*, 131(2), 150-161. <https://doi.org/10.1642/AUK-13-206.1>.
- Gong, J., Yu, H., Liu, T., Gill, J. J., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., & Sabour, P. M. (2008). Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler

- chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1372-1382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03699.x>.
- Grizard, S., Dini-Andreote, F., Tieleman, B. I., & Salles, J. F. (2014). Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation. *Ecology and evolution*, 4(7), 1140-1157. <https://doi.org/10.1002/ece3.1011>.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabba, D., Highlander, S., Sordergren, E., Methé, B., & DeSantis, T. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research*, 21(3), 494-504. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.112730.110>.
- Hamady, M., & Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. *Genome research*, 19(7), 1141-1152. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.085464.108>.
- Hammons, S., Oh, P. L., Martínez, I., Clark, K., Schlegel, V. L., Sitorius, E., Scheideler, S., & Walter, J. (2010). A small variation in diet influences the *Lactobacillus* strain composition in the crop of broiler chickens. *Systematic and applied microbiology*, 33(5), 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.003>.
- Hang, J., Desai, V., Zavaljevski, N., Yang, Y., Lin, X., Satya, R. V., Martínez, L., Blaylock, J., Jarman, R., Thomas, S., & Kuschner, R. A. (2014). 16S rRNA gene pyrosequencing of reference and clinical samples and investigation of the temperature stability of microbiome profiles. *Microbiome*, 2(1), 31. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-31>.
- Hou, Q., Kwok, L. Y., Zheng, Y., Wang, L., Guo, Z., Zhang, J., Huang, W., Wang, Y., & Zhang, H. (2016). Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits. *Scientific reports*, 6, 37376. <https://doi.org/10.1038/srep37376>.
- Huang, P., Zhang, Y., Xiao, K., Jiang, F., Wang, H., Tang, D., Liu, B., Liu, Y., He, X., Liu, H., Liu, X., Oing, Z., Liu, C., Huang, J., Ren, Y., Yun, L., Yin, L., Lin, O., Zeng, C., Su, X., Yuan, J., Lin, L., Hu, N., Cao, H., Huang, S., Guo, Y., Fan, W., & Zeng, J. (2018). The chicken gut metagenome and the modulatory effects of plant-derived benzylisoquinoline alkaloids. *Microbiome*, 6(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0590-5>.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannan, B. J. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10), 4399-4406. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001.
- Hunter, S., Corbett, M., Denise, H., Fraser, M., Gonzalez-Beltran, A., Hunter, C., Jones, P., Leionen, R., McAnulla, C., Maguire, E., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Oisel, A., Pesseat, S., Radhakrishnan, R., Rocca, P., Scheremetjew, M., Sterk, P., Vaughan, D., Cochrane, G., Field, D., & Sansone, S. (2013). EBI metagenomics—a new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. *Nucleic acids research*, 42(D1), D600-D606. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt961>.
- Jia, W., Slominski, B. A., Bruce, H. L., Blank, G., Crow, G., & Jones, O. (2009). Effects of diet type and enzyme addition on growth performance and gut health of broiler chickens during subclinical *Clostridium perfringens* challenge. *Poultry science*, 88(1), 132-140. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00204>.
- Josefsen, M. H., Andersen, S. C., Christensen, J., & Hoorfar, J. (2015). Microbial food safety: Potential of DNA extraction methods for use in diagnostic metagenomics. *Journal of microbiological methods*, 114, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.01>.
- Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. (2012). Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS one*, 7(6), e39315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039315>.
- Kuczynski, J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Clemente, J. C., Gevers, D., & Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.1038/nrg3129>.
- Lan, P. T. N., Hayashi, H., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2002). Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiology and immunology*, 46(6), 371-382. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02709.x>.
- Lee, S., La, T. M., Lee, H. J., Choi, I. S., Song, C. S., Park, S. Y., Lee, J., & Lee, S. W. (2019). Characterization of microbial communities in the chicken oviduct and the origin of chicken embryo gut microbiota. *Scientific reports*, 9(1), 6838. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43280-w>.
- Lingner, T., Aßhauer, K. P., Schreiber, F., & Meinicke, P. (2011). CoMet—a web server for comparative functional profiling of metagenomes. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W518-W523. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr388>.
- Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic acids research*, 36(18), e120-e120. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn491>.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J., & Lee, M. D. (2003). Diversity and succession of the

- intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(11), 6816-6824. DOI: 10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003.
- Luo, C., Rodriguez-r, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). MyTaxa: an advanced taxonomic classifier for genomic and metagenomic sequences. *Nucleic acids research*, 42(8), e73-e73. <https://doi.org/10.1093/nar/gku169>.
- Ma, L., Xia, Y., Li, B., Yang, Y., Li, L. G., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2015). Metagenomic assembly reveals hosts of antibiotic resistance genes and the shared resistome in pig, chicken, and human feces. *Environmental science & technology*, 50(1), 420-427. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03522>.
- Mandal, R. S., Saha, S., & Das, S. (2015). Metagenomic surveys of gut microbiota. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(3), 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.005>.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>.
- Martín-Platero, A. M., Peralta-Sánchez, J. M., Soler, J. J., & Martínez-Bueno, M. (2010). Chelex-based DNA isolation procedure for the identification of microbial communities of eggshell surfaces. *Analytical biochemistry*, 397(2), 253-255. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.10.041>.
- Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R. V., Jost, S., Ottenwaelder, B., Schloetterer, C., & Boenigk, J. (2010). Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Molecular ecology*, 19, 32-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04478.x>.
- Meng, H., Zhang, Y., Zhao, L., Zhao, W., He, C., Honaker, C. F., Zhai, Z., Sun, Z., & Siegel, P. B. (2014). Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota. *PLoS One*, 9(3), e89862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089862>.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>.
- Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N. T., & Lieb, B. (2010). Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-7>.
- Morgan, X. C., Segata, N., & Huttenhower, C. (2013). Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends in genetics*, 29(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.09.005>.
- Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 245-256. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>.
- Neelakanta, G., & Sultana, H. (2013). The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities. *Microbiology insights*, 6, MBI-S10819. <https://doi.org/10.4137/MBI.S10819>.
- Neira, C., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2017). Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *International journal of food microbiology*, 262, 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.008>.
- OECD/FAO. (2018). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027*. OECD Publishing, Paris/FAO, Rome. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2018-e.
- OECD/FAO. (2014). *OECD-FAO. Perspectivas Agrícolas 2014-2023*. OECD Publishing. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2014-es.
- Olsen, R., Kudirkiene, E., Thøfner, I., Pors, S., Karlskov-Mortensen, P., Li, L., Papasolomontos, S., Angastiniotou, C., & Christensen, J. (2017). Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poultry science*, 96(11), 3901-3911. <https://doi.org/10.3382/ps/pex182>.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>.
- Ounit, R., Wanamaker, S., Close, T. J., & Lonardi, S. (2015). CLARK: fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers. *BMC genomics*, 16(1), 236. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1419-2>.
- Pan, D., & Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut microbes*, 5(1), 108-119. <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>.
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics*, 52(4), 413-435. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>.
- Pineda-Quiroga, C., Camarinha-Silva, A., Atxaerandio, R., Ruiz, R., & García-Rodríguez, A. (2017). Changes in broiler performance, duodenal histomorphometry, and caeca microbiota composition in response to wheat-barley based diets supplemented with non-antibiotic additives. *Animal feed science and technology*, 234, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.09.002>.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research*, 35(21), 7188-7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>.
- Qu, A., Brulc, J. M., Wilson, M. K., Law, B. F., Theoret, J. R., Joens, L. A., ... & Nelson, K. E. (2008). Comparati-

- ve metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS one*, 3(8), e2945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002945>.
- Ríos, S., & Ríos, L. (2011). Principal molecular markers used to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2470-2483.
- Roux, S., Tournayre, J., Mahul, A., Debroas, D., & Enault, F. (2014). Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. *BMC bioinformatics*, 15(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-76>.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, B., Oakley, B., Parks, D., Robinson, C., Sahl, J., Stress, B., Thallinger, G., Van Horn, D., & Weber, C. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(23), 7537-7541. DOI: 10.1128/AEM.01541-09.
- Schmid, M., Nanda, I., Guttenbach, M., Steinlein, C., Hoehn, M., Schartl, M., Haaf, T., Weigend, S., Fries, R., Buerstedde, J., Wimmers, K., Burt, D., Smith, J., A'Hara, S., Law, A., Griffin, D., Bumstead, N., Kaufman, J., Thomson, P., Burke, T., Groenen, M., Crooijmans, R., Vignal, A., Fillon, V., Morisson, M., Pitel, F., Tixier-Boichard, M., Ladjali-Mohammedi, K., Hillel, J., Maki-Tania, A., Cheng, H., Delany, M., Burside, J., & Mizuno, S. (2000). First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenetic and Genome Research*, 90(3-4), 169-218. <https://doi.org/10.1159/000056772>.
- Shaafi, M. A. M., Sieo, C. C., Chong, C. W., Gan, H. M., & Ho, Y. W. (2015). Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut pathogens*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0051-7>.
- Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T., Penn, C. W., & Pallen, M. J. (2012). High-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons: effects of extraction procedure, primer length and annealing temperature. *PLoS one*, 7(5), e38094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038094>.
- Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T. A., Bedford, M. R., Penn, C. W., & Pallen, M. J. (2014). Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS one*, 9(3), e91941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941>.
- Seshadri, R., Kravitz, S. A., Smarr, L., Gilna, P., & Frazier, M. (2007). CAMERA: a community resource for metagenomics. *PLoS biology*, 5(3), e75. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050075>.
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*, 5, 209. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>.
- Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4), 1153-1161. DOI: 10.1128/AEM.02345-10.
- Singh, K. M., Shah, T. M., Reddy, B., Deshpande, S., Rank, D. N., & Joshi, C. G. (2014). Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. *Journal of applied genetics*, 55(1), 145-154. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0179-4>.
- Smulikowska, S. (2006). Manipulation of the poultry ecosystem through biotechnology. In *Biology of Growing Animals* (Vol. 4, pp. 597-609). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1877-1823\(09\)70108-0](https://doi.org/10.1016/S1877-1823(09)70108-0).
- Stanley, D., Denman, S. E., Hughes, R. J., Geier, M. S., Crowley, T. M., Chen, H., Haring, V., & Moore, R. J. (2012). Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(5), 1361-1369. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3847-8>.
- Stanley, D., Geier, M. S., Hughes, R. J., Denman, S. E., & Moore, R. J. (2013). Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS one*, 8(12), e84290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084290>.
- Su, C. H., Hsu, M. T., Wang, T. Y., Chiang, S., Cheng, J. H., Weng, F. C., Kao, C. Y., Wang, D., & Tsai, H. K. (2011). MetaABC—an integrated metagenomics platform for data adjustment, binning and clustering. *Bioinformatics*, 27(16), 2298-2299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr376>.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics—a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>.
- Tong, P., Ji, X., Chen, L., Liu, J., Xu, L., Zhu, L., Zhou, W., Liu, G., Wang, S., Guo, X., Feng, S., & Sun, Y. (2017). Metagenome analysis of antibiotic resistance genes in fecal microbiota of chickens. *Agri Gene*, 5, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2017.06.001>.
- Torok, V. A., Allison, G. E., Percy, N. J., Ophel-Keller, K., & Hughes, R. J. (2011). Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(10), 3380-3390. DOI: 10.1128/AEM.02300-10.
- Varmuzova, K., Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Sisak, F., Havlickova, H., Sebkova, A., Faldynova, M., & Rychlik, I. (2016). Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella* Enteritidis infection. *Frontiers in microbiology*, 7, 957. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00957>.
- Videnska, P., Sedlar, K., Lukac, M., Faldynova, M., Gerzova, L., Cejkova, D., Sisak, F., & Rychlik, I. (2014). Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole

- life. *PLoS One*, 9(12), e115142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115142>.
- Vieira, D. A., Cabral, L., Noronha, M. F., Júnior, G. V., & Sant'Ana, A. S. (2019). Microbiota of eggs revealed by 16S rRNA-based sequencing: From raw materials produced by different suppliers to chilled pasteurized liquid products. *Food control*, 96, 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.016>.
- Wang, L., Lilburn, M., & Yu, Z. (2016). Intestinal microbiota of broiler chickens as affected by litter management regimens. *Frontiers in microbiology*, 7, 593. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00593>.
- Wang, S., Chen, L., He, M., Shen, J., Li, G., Tao, Z., Wu, R., & Lu, L. (2018). Different rearing conditions alter gut microbiota composition and host physiology in Shaoxing ducks. *Scientific reports*, 8(1), 7387. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25760-7>.
- Wei, S., Lilburn, M., & Yu, Z. (2016). The bacteriomes of ileal mucosa and cecal content of broiler chickens and turkeys as revealed by metagenomic analysis. *International journal of microbiology*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4320412>.
- Wise, M. G., & Siragusa, G. R. (2007). Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1138-1149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03153.x>.
- Wommack, K. E., Bhavsar, J., Polson, S. W., Chen, J., Dumas, M., Srinivasiah, S., Furman, M., Jamindar, S., & Nasko, D. J. (2012). VIROME: a standard operating procedure for analysis of viral metagenome sequences. *Standards in genomic sciences*, 6(3), 421. DOI:10.4056/sigs.2945050.
- Xiong, W., Wang, Y., Sun, Y., Ma, L., Zeng, Q., Jiang, X., Li, A., Zeng, Z., & Zhang, T. (2018). Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*, 6(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0419-2>.
- 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, 45308. <https://doi.org/10.1038/srep45308>.
- Yeoman, C. J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N. D., & White, B. A. (2012). The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews*, 13(1), 89-99. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1466252312000138>.
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36(5), 808-812. <https://doi.org/10.2144/04365ST04>.
- Zhao, L., Wang, G., Siegel, P., He, C., Wang, H., Zhao, W., Zhai, Z., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Sun, Z., Chen, W., Zhang, Y., & Meng, H. (2013). Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. *Scientific reports*, 3, 1163. <https://doi.org/10.1038/srep01163>.
- Zhao, Y., Li, K., Luo, H., Duan, L., Wei, C., Wang, M., Jim, J., Liu, S., Mehmood, K., & Shahzad, M. (2019). Comparison of the Intestinal Microbial Community in Ducks Reared Differently through High-Throughput Sequencing. *BioMed research international*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9015054>.
- Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y., & Joerger, R. D. (2002). 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(1), 124-137. DOI: 10.1128/AEM.68.1.124-137.2002.