



OIKOS Chile Ltda-Universidad de Chile

Informe Final

*“Evaluación de la inclusión de probióticos
en el agua de bebida de pollos broiler sobre
parámetros productivos y salud intestinal”*

15 de marzo, 2013

*Documento elaborado por:
Dra. Carolina Valenzuela V. M.V, Dr. Nutrición y Alimentos.
Dra. María Sol Morales S. M.V. MSc. PhD.*

1. INTRODUCCIÓN

Según Food and Agriculture Organization of the United Nations (2001) los probióticos son: "Microorganismos vivos que cuando son ingeridos en cantidades adecuadas, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales". Las ventajas potenciales de los probióticos se basan en que promueven el desarrollo de microorganismos específicos a nivel intestinal restituyendo y/o manteniendo el equilibrio microbiano, lo que genera numerosos beneficios tanto para la salud humana y animal (Cross, 2002).

Los probióticos han recibido un gran interés en el último tiempo en el área agropecuaria ya que se han utilizado como posibles alternativas de reemplazo a los antibióticos, para su uso como promotores del crecimiento (Anadón *et al.*, 2006), y también para el control de patógenos entéricos (Boyle *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Wolfenden *et al.*, 2007). En la actualidad, no existe una clase universal de bacterias utilizadas como probióticos, los tipos más comunes han sido bacterias ácido lácticas (BAL), que se encuentran normalmente en el tracto gastrointestinal de vertebrados e invertebrados. Las BAL son principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y otros, que han demostrado beneficios a la salud y se han utilizado ampliamente en alimentación animal de forma segura (Téllez *et al.*, 2006). Otras cepas utilizadas son las bifidobacterias, que también son un componente importante de la microbiota intestinal de aves (Amit-Romach *et al.*, 2004), y ejercen efectos positivos cuando se administran a otros animales como los cerdos lechones (Shu *et al.*, 2001; Modesto *et al.*, 2009). Una segunda clasificación de cultivos probióticos son aquellos microorganismos que no se encuentran normalmente en el tracto gastrointestinal (flora autóctona). Por ejemplo, *Saccharomyces boulardii* que ha demostrado ser eficaz en la prevención de la recurrencia de las infecciones por *Clostridium difficile* (Czerucka *et al.*, 2007), y algunas colibacilosis (Czerucka y Rampal, 2002). Otros microbios probióticos autóctonos son las bacterias formadoras de esporas, normalmente del género *Bacillus*.

En relación a la investigación del uso de probióticos en producción animal, éstos se han estudiado en varias especies como cerdos, aves, bovinos etc., mostrando alentadores resultados. Específicamente en producción aviar varios estudios de laboratorio y campo, en los cuales se han utilizado BAL, han demostrado un desarrollo acelerado de la microflora normal de pollos y pavos, proporcionando una mayor resistencia a infecciones por *Salmonella* sp. (Farnell *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2008; Higgins *et al.*, 2010), *Clostridium perfringens* (La Ragione *et al.*, 2004), *Campylobacter jejuni* (Morishita *et al.*, 1997; Willis y Reid, 2008), entre otros. Las BAL también han demostrado un efecto protector sobre la carne de pollo cruda frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* (Maragkoudakis *et al.*, 2009). Por otra parte, los probióticos que se han ensayado a escala comercial han indicado que la administración adecuada de ellos en pavos y pollos, aumentan el rendimiento y reducen los costos de producción (Torres-Rodríguez *et al.*, 2007, Vicente *et al.*, 2007).

Dado la reciente legislación internacional y las presiones internas de los consumidores de retirar los antibióticos como agentes promotores del crecimiento, y que su uso sólo se limite para el tratamiento de infecciones bacterianas, debido a la creciente preocupación por la propagación de la resistencia a los antibióticos en los seres humanos (Feed Additives Regulation 1831/2003/EC; Schwartz *et al.*, 2001), los probióticos pueden ofrecer opciones alternativas ayudando a mantener la salud intestinal de los animales con el fin de prevenir o reducir la prevalencia de patógenos en la cadena alimentaria. Lo que abre una gran oportunidad de mercado y genera también retos relacionados con la búsqueda de nuevos microorganismos que actúen como probióticos y su estudio. Los nuevos avances en la aplicación de los probióticos en alimentación animal, serán dirigidos a producir cambios significativos en la fisiología intestinal y proporcionar niveles más altos respecto de la salud y bienestar en los animales, además de mejorar los parámetros de rendimiento productivo. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la incorporación de probióticos suministrados por la empresa OIKOS Chile Ltda en el agua de bebida de pollos broiler sobre la respuesta productiva y salud intestinal.

2. METODOLOGÍA

2.1. Probióticos: Los probióticos utilizados en este estudio fueron suministrados por la empresa OIKOS Chile Ltda, presentados en estado líquido y almacenados en un recipiente plástico durante 42 días. Se tomaron muestras de 50 mL en triplicado de los probióticos los días 22 y 42 del estudio para realizar un recuento de anaeróbios mesófilos (RAM) y también alícuotas de 0,5 mL que se procesaron para la observación de la morfología de los microorganismos por microscopía electrónica de barrido (MEB) en el Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales de FAVET.

2.2. Animales: Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se utilizaron 240 pollos broiler Ross 308 machos.

2.3. Manejo: Los animales se mantuvieron en corrales de piso con camas de viruta de madera. La ventilación se realizó mediante cortinas ubicadas a lo largo del galpón. Se midió la T° ambiental 3 veces al día mediante termómetros de mínimas y máximas ubicado a nivel de 20 cm del suelo. A los animales se les ofreció agua de bebida potable y alimentación *ad libitum*. El alimento fue adquirido en la división industrial para pollos broiler de alimentos Cisternas S.A., y fue sometido a análisis químico proximal (AOAC, 1996) en el Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). El alimento cumplió con los requerimientos nutricionales para pollos broiler.

2.4. Diseño experimental: Se realizó un estudio piloto en donde los animales se distribuyeron aleatoriamente después de ser pesados a 3 grupos de tratamientos, cada uno en cuadruplicado (n=20): control (sin la incorporación de probióticos), T1 (35 mL de probióticos/día/20 animales) y T2 (70 mL de probióticos/día/20 animales). Los probióticos se administraron de forma manual utilizando una jeringa y fueron incorporados homogéneamente al agua de los bebederos diariamente a la misma hora (3 pm) durante 42 días.

2.5. Parámetros de rendimiento productivo: Todos los pollos se pesaron individualmente utilizando una romana en el momento de la asignación a los corrales y a los días de estudio: 10, 22, 30 y 42 para determinar el peso vivo (PV). Una hora antes del pesaje las dietas fueron retiradas para todas las aves. Se calculó el consumo de alimento (CA) los días 22 y 42, para esto se registró el alimento ofrecido a los animales y en los días respectivos se vaciaron los restos de alimentos desde los comederos y se pesaron, obteniendo el CA por diferencia. Además se calcularon los siguientes indicadores productivos: ganancia de peso vivo (GPV) (Ecuación 1), eficiencia de conversión alimenticia (ECA) (Ecuación 2), y mortalidad (M%). Además se determinó el rendimiento de carne de pechuga (extracción de pechuga con el hueso y sin grasa) y trutro largo con encuentro (sin grasa), respecto del animal completo, y se expresó como porcentaje.

Ec. 1.	$GP = \frac{Pf - Pi}{42}$ <p>Donde: Pf es peso final, Pi es peso inicial y 42 corresponde a los días de duración del ensayo.</p>
Ec. 2.	$ECA = \frac{CAT_{período} / animal}{Pf}$ <p>Donde: CAT es consumo total de alimento en el período (Kg), Pf peso final total en el período (Kg).</p>

2.6. Enumeración de poblaciones bacterianas: Durante el pesaje de los animales en los días 22 y 42 de vida de los pollos se tomaron muestras de 10 g de heces en triplicados desde un pool de heces obtenido a partir de todas las aves, las cuales fueron almacenadas en bolsas especiales y rotuladas según los tratamientos correspondientes. Se cuantificaron las siguientes poblaciones bacterianas: recuento de aeróbios mesófilos (RAM), enterobacterias (EB), coliformes totales (CT) y anaeróbios (AN) en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de FAVET. A partir del pool de heces se tomaron muestras en triplicado con hisopos Clary

Blair para determinar *Salmonella entérica* y *E. coli* enteropatógena procesadas en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET.

2.7. Análisis morfométrico de intestino: En los días de estudio 22 y 42 se sacrificaron por dislocación cervical 8 animales seleccionados al azar de cada grupo, para realizar necropsias. Se retiró el tracto intestinal (duodeno a recto) y se tomaron muestras de 1 cm de largo de duodeno, las cuales se fijaron en formalina al 3,7% por 48 hrs. Posteriormente los cortes se procesaron para realizar un estudio histopatológico en el cual se realizaron las siguientes mediciones (μm): largo y ancho de las vellosidades intestinales, profundidad de las criptas, y largo de la mucosa intestinal (Figura 1), por microscopía óptica y el apoyo de un software de medición.

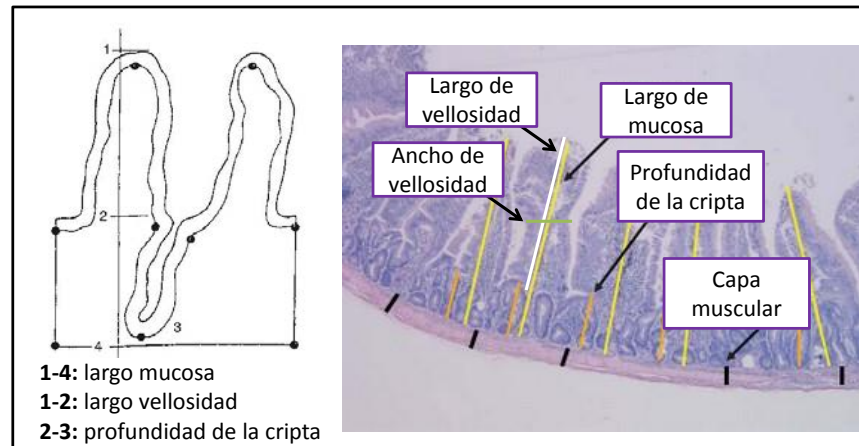


Figura 1. Esquema explicativo de las mediciones realizadas en duodeno de pollos. La medición de la capa muscular no se realizó.

2.8. Análisis estadístico: Se utilizó ANDEVA y una prueba de tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y de tratamiento con la ayuda del software Statistix 8. En los análisis de la sección 2.5 y 2.6 se utilizó un nivel de significancia de $p < 0,01$, y para los análisis de la sección 2.7 fue de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Rendimiento productivo

3.1.1. Peso vivo (PV) y ganancia de peso vivo (GPV): En la Figura 2 se presenta la variación de PV (2a) y GPV (2b). En el caso del PV en el día 0 no se observaron diferencias significativas entre los grupos, pero ya al día 10 los animales suplementados con probióticos mostraron un significativo mayor peso (≈ 170 g) que los animales control (159 g), independiente de la dosis de probiótico utilizada. Al día 22 los animales del grupo T1 (486 g) fueron los que obtuvieron un significativo mayor peso en comparación al control (448 g) y T2 (472 g). Al día 30 la tendencia fue similar obteniendo mayores pesos los animales T1 (954 g) y T2 (956 g), respecto el control (864 g). Sin embargo, el día 42 no se observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamientos y el control. En el caso de los valores de GPV, éstos mostraron una tendencia similar.

No se observó un efecto sobre el PV y GPV dependiente de la dosis de probiótico utilizada, pudiendo utilizarse la concentración más baja de 35 mL/día/20 animales, para generar un aumento de PV y GPV en pollos broiler.

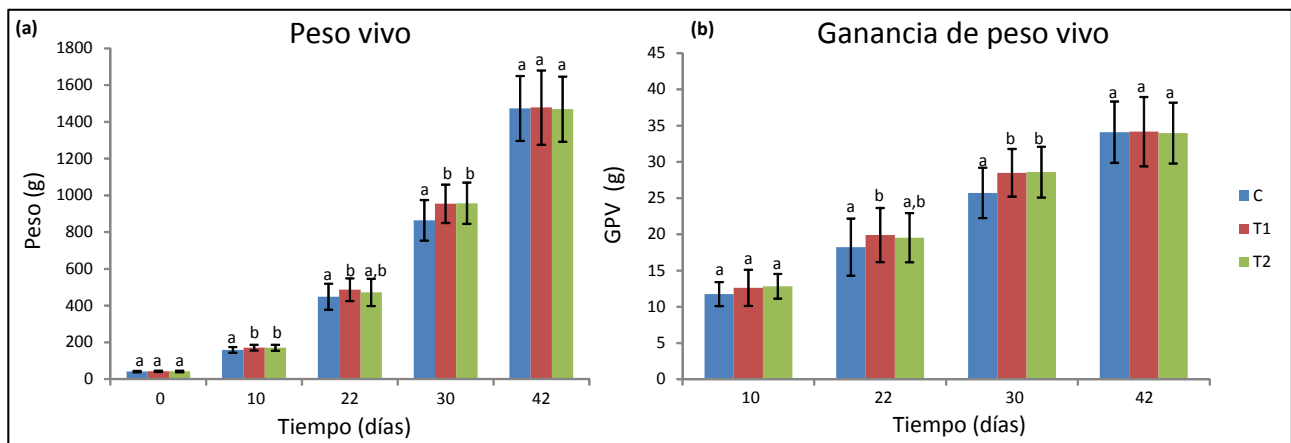


Figura 2. Variación del peso vivo (PV) y ganancia de peso vivo (GPV) de pollos broiler durante un ciclo de vida de 42 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Respecto al PV los valores obtenidos al día 42 del estudio ($\approx 1,47$ Kg) fueron bastante inferiores a los propuestos por la línea genética de 2,6 Kg (Tabla 1), debido al bajo consumo de alimento registrado para todos los animales durante el estudio (Tabla 1). Siendo del 30% de lo recomendado para la línea genética al día 22 y del 50% al día 42. Hecho que se relacionó con las altas temperaturas registradas en el galpón de crianza ($27-34^{\circ}\text{C}$) durante el período comprendido entre los meses de noviembre a enero del año 2012 (Figura 3), las cuales fueron superiores al óptimo establecido para la crianza de pollos broiler, ya que la T° promedio diaria registrada en el galpón de crianza superó el límite crítico de la zona de termoneutralidad de los pollos entre $20-25^{\circ}\text{C}$ (denotado en la Figura 2 con una línea punteada), después del día 12 de crianza, lo que repercute directamente en la disminución abrupta del consumo de alimento (Rahimi, 2005). Sin embargo, bajo estas condiciones de estrés a las cuales estuvieron sometidos todos los animales, el uso de probióticos generó un mayor PV y GPV en los animales T1 y T2, con excepción del día 42, lo cual se explica con mayor detalle más adelante en el texto (sección 3.2).

Tabla 1. Consumo de alimento (CA) y peso vivo (g) por animal.

Grupo	CA (g/animal)		Grupo	Peso vivo (g/animal)	
	Día 22	Día 42		Día 22	Día 42
CA esperado	109	210	Peso esperado	996	2.667
C	30,52	118,31	C	448 ± 71	1.473 ± 177
T1	29,51	100,00	T1	486 ± 62	1.477 ± 202
T2	29,10	98,59	T2	472 ± 73	1.469 ± 178

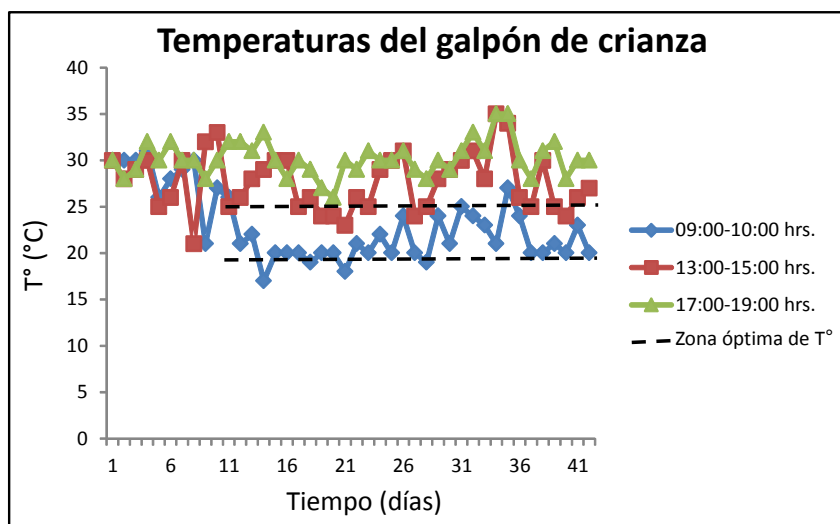


Figura 3. Temperaturas (T°) registradas en 3 horarios diferentes en el galpón de crianza de pollos, durante 42 días.

3.1.2. Eficiencia de conversión alimenticia (ECA): Los valores de ECA, indicador del comportamiento productivo que refleja la capacidad de convertir los nutrientes en peso vivo, obtenidos en este estudio, se presentan en la Figura 4. La ECA se encontró dentro de los rangos esperables dentro de la crianza comercial. Se observa que la utilización de probióticos generó una disminución significativa de la ECA en pollos broiler de los grupos T1 ($1,8 \pm 0,1$) y T2 ($1,8 \pm 0,1$), en comparación al control ($2,1 \pm 0,1$), mejorando este parámetro, independiente de la dosis utilizada. Esto se explica debido a la menor cantidad de alimento (Tabla 1), que ingirieron los animales suplementados con probióticos para llegar a pesos similares de los animales control al día 42.

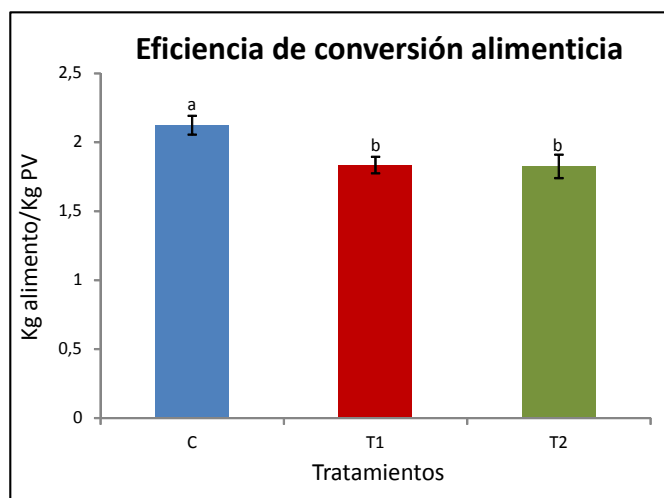


Figura 4. Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) al día 42. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

3.1.3. Mortalidad: El porcentaje de mortalidad obtenido en este estudio fue bajo ($\approx 2\%$), y se encontró dentro de los rangos esperables en un manejo productivo comercial. Las muertes se debieron principalmente a casos por aplastamientos entre los mismos animales.

3.1.4. Rendimiento muscular: En la Figura 5 se presenta el rendimiento de carne de pechuga (P) y trutro largo con encuentro (TE) de los animales al día 42. Se observó que los pollos pertenecientes a los grupos T1 (P: 19,2%, TE: 9,2%) y T2 (P: 18,5%, TE: 9,5%) mostraron un rendimiento muscular de la zona de la pechuga y trutro largo-encuentro significativamente superior a los animales controles (P: 17,5%, TE: 9,0%). Para el caso de la pechuga el mayor rendimiento se obtuvo en los animales T1, y para el trutro largo-encuentro fue el tratamiento T2.

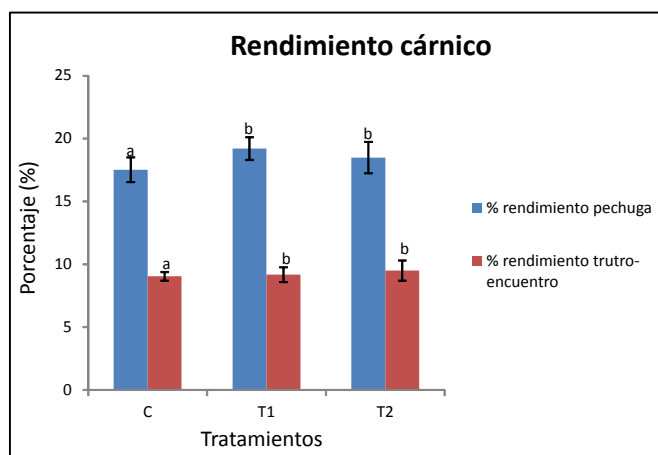


Figura 5. Eficiencia de conversión alimenticia (ECA) al día 42. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa en cada categoría ($p < 0,01$).

3.2. Enumeración de poblaciones bacterianas: En la Figura 6 se presenta la cuantificación de las poblaciones bacterianas desde heces de pollos broiler al día 22 (6a) y 42 (6b). Se observa que el efecto de los probióticos sobre los microorganismos fue más evidente al día 22. En relación a los recuentos microbianos RAM no fue afectado significativamente por el uso de probióticos, a diferencia de una disminución significativa de enterobacterias (EB), coliformes totales (CT) (sólo con el tratamiento T2), y anaeróbios (AN)

en el día 22. Para el caso de las EB se observó un efecto de la dosis en donde el tratamiento T2 disminuyó significativamente el recuento de estas bacterias en comparación con el T1.

Para el día 42 no se observó un efecto significativo de los probióticos sobre las cuentas de RAM, EB y CT. En cambio el recuento de bacterias AN disminuyó significativamente independiente de la dosis utilizada.

Los análisis que determinaban *Salmonella entérica* y *E. coli* enteropatógena resultaron negativos en todas las muestras de los grupos control y tratamientos.

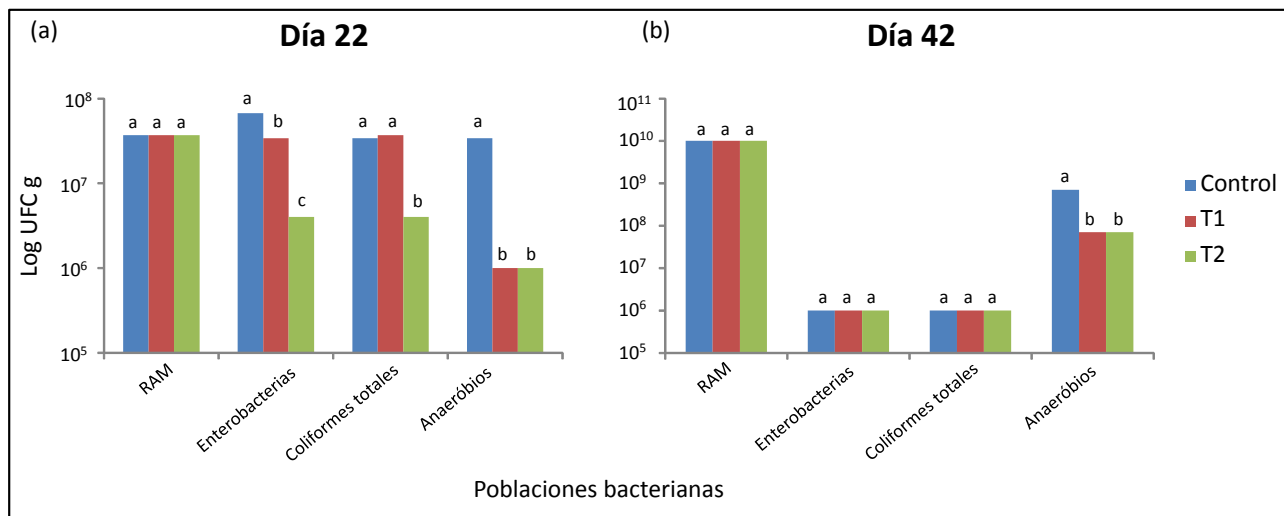


Figura 6. Poblaciones bacterianas en heces de pollos broiler al día 22 y 42 de vida. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Por otra parte al analizar los recuentos bacterianos provenientes desde las muestras de probióticos se obtuvo un mayor número de UFC, y por tanto, mejor viabilidad en la muestra del día 22 ($4,3 \times 10^4$ UFC/g), en comparación al día 42 ($6,3 \times 10^3$ UFC/g). Lo que podría explicar la mayor efectividad de los probióticos sobre algunos tipos bacterianos al día 22. Esta información se pudo complementar con las imágenes obtenidas desde el análisis de MEB realizado a los probióticos, las cuales se presentan en la Figura 7. Se observa que los microorganismos del día 22 fueron de morfología esférica, límites definidos y en las muestras se encontró una gran cantidad de ellos, en cambio al día 42 su número se redujo, lo que dificultó la obtención de fotografías. Además se perdió la forma esférica, encontrando pleomorfismos y lisis celular con mayores cantidades de detritus celulares en las muestras, lo que se relaciona posiblemente con el mayor tiempo de almacenamiento de los probióticos, y las condiciones de almacenamiento (alta temperatura), ya que éstos organismos son bastante sensibles a las condiciones del medio como pH, T°, humedad relativa, y cantidad de sustrato (Abe *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 2005).

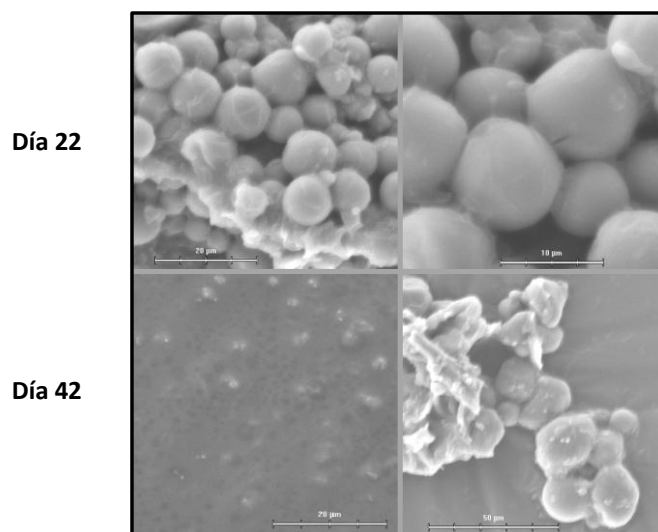


Figura 7. Fotografías obtenidas por MEB de probióticos al día 22 y 42 con diferentes aumentos.

El menor número de microorganismos probióticos y su menor viabilidad determinada por microbiología y MEB podrían explicar lo observado en el análisis de PV y GPV (sección 3.1.1), en donde a los días 10, 22, y 30 los probióticos aumentaron significativamente ambos parámetros, pero al día 42 no se observó un efecto.

3.3. Análisis morfométrico de intestino: En la Figura 8 se presentan los análisis de la morfometría de cortes histológicos de duodeno de pollos broiler para los días 22 y 42 de estudio. Los valores encontrados en este estudio para las vellosidades intestinales se encuentran dentro de los rangos normales reportados por otros autores (Sen *et al.*, 2012).

La morfología de las vellosidades intestinales incluyendo altura, ancho y profundidad de las criptas, son indicativos de la salud intestinal en pollos de engorde. El aumento de altura y ancho de las vellosidades, respecto la profundidad de la cripta se correlacionan directamente con un aumento volumen de absorción epitelial. Se considera que el acortamiento de las vellosidades y criptas más profundas llevan a una disminución en la absorción de nutrientes, aumento de la secreción en el tracto gastrointestinal, y un rendimiento productivo reducido (Fan *et al.*, 1997; Samanya y Yamauchi, 2002).

En el día 22, el parámetro largo de la mucosa total (MT) no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento T2, pero T1 tuvo un significativo menor tamaño. En cuanto al largo de las vellosidades (LV), T1 y T2 fueron más cortas que el control, pero T2 no mostró diferencias significativas con el grupo control. En relación al ancho de las vellosidades (AV), para este parámetro se observó un efecto significativo de la mayor dosis utilizada de probióticos, siendo significativamente más anchas las vellosidades del grupo T2. Finalmente en relación a la profundidad de la cripta (PC), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Para el día 42, se observó un mayor efecto de los probióticos sobre los parámetros morfométricos de duodeno, mostrando un mayor largo de MT el tratamiento T2, y vellosidades intestinales más largas para los grupos T1 y T2. El AV y PC no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

A continuación en la Figura 9 se presentan fotografías de cortes histológicos de duodeno de pollos del día 42, en donde no se observan mayores diferencias entre los grupos de tratamientos.

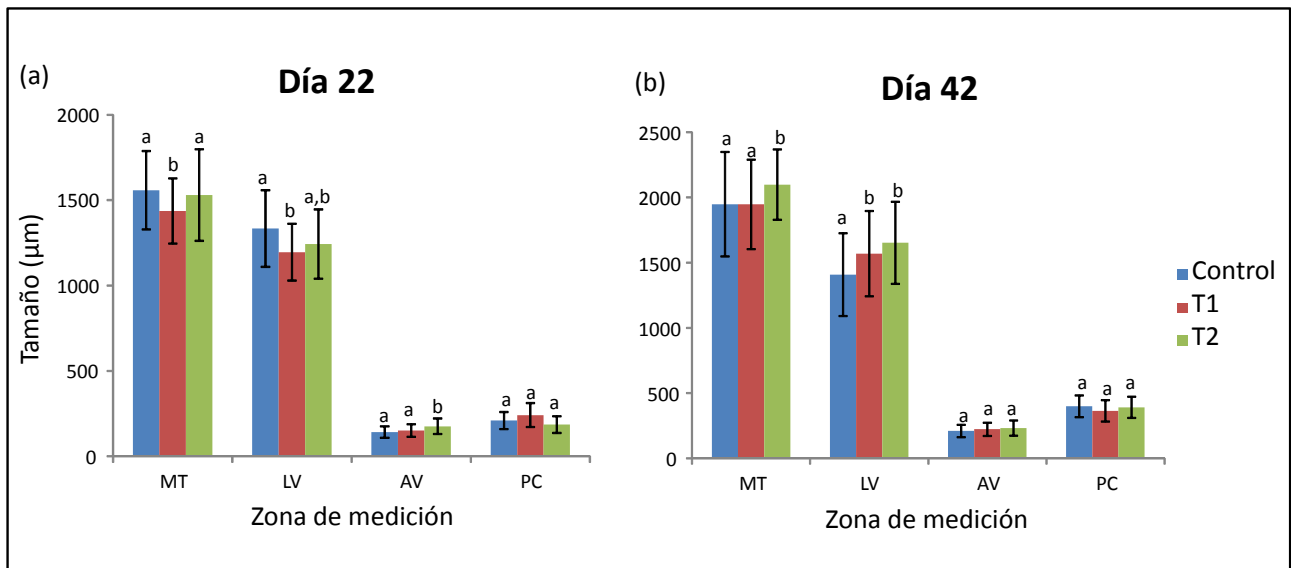


Figura 8. Morfometría de duodeno de pollos broiler a los días 22 y 42 de estudio. MT: mucosa total. LV: largo de la vellosidad intestinal. AV: ancho de la vellosidad intestinal. PC: profundidad de la cripta. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

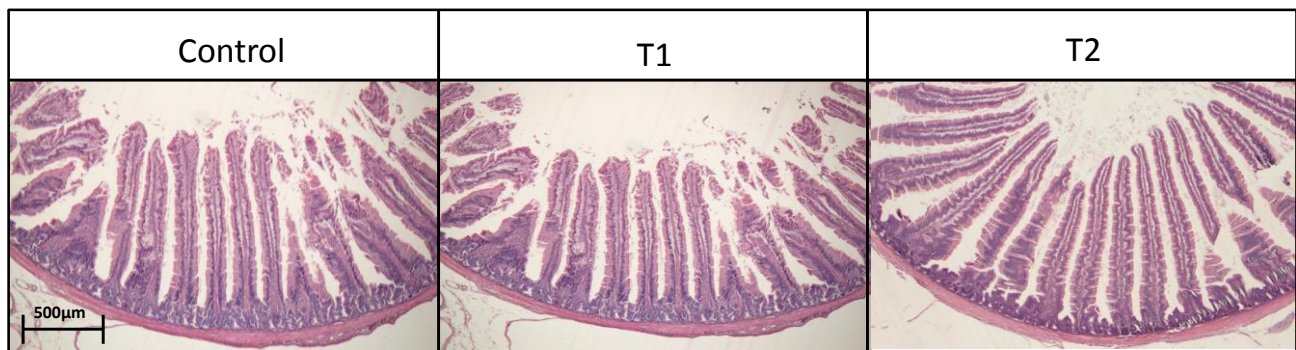


Figura 9. Fotografías de cortes histológicos de duodeno de pollos al día 42 de estudio, para todos los grupos de tratamiento.

4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que los animales que recibieron probióticos a través del agua de bebida presentaron mejores indicadores productivos como peso vivo y ganancia de peso vivo durante el ensayo, tal como lo han reportado otros autores (Cavazzoni *et al.*, 1998; Timmerman *et al.*, 2006; Wang y Gu, 2010; Sen *et al.*, 2012), con excepción del día 42, lo que se pudo deber a una menor viabilidad del probiótico por las condiciones de almacenamiento, pudiendo disminuir este efecto con una renovación del probiótico periódicamente. Con respecto al bajo peso obtenido por los animales debido al bajo consumo de alimento que éstos presentaron, este fenómeno se explica por las condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento de los animales (De Basilio *et al.*, 2002), lo que gatilló en la disminución del consumo de alimento.

La ECA y el rendimiento cárnico se vieron mejorados significativamente con la utilización de probióticos. Las mejoras en los parámetros productivos mencionados anteriormente fueron independientes de las dosis utilizadas, por tanto, se recomienda la utilización de la dosis más baja (35 mL/20 animales 1 vez al día). Otros autores tampoco encontraron diferencias significativas sobre éstos parámetros al utilizar mayores dosis de probióticos (Wang y Gu, 2010). En la literatura las mejoras en los parámetros productivos se han explicado debido al efecto acumulativo de la acción de los probióticos que promueven una mejor digestión y absorción de los nutrientes (Shim *et al.*, 2010) por aumento de la producción de las enzimas digestivas, y la menor producción de amoníaco (Jin *et al.*, 2000).

En relación a los recuentos bacterianos, se observó que la suplementación con probióticos disminuyó enterobacterias, coliformes totales y anaeróbios el día 22 y sólo anaerobios el día 42. Además el día 22 la dosis entregada en el tratamiento T2 mostró una disminución significativa de enterobacterias y coliformes totales, respecto de los otros grupos. Pero al día 42 no se observó un efecto de la dosis en la reducción de anaeróbios, lo que también fue observado por Sen *et al.* (2012), quienes suplementaron pollos broiler con *Bacillus subtilis*, que produjo una reducción de los coliformes, independiente de la dosis utilizada.

Según varios autores los cambios generados en la microbiota intestinal por efecto de los probióticos también explican las mejoras de los parámetros productivos mencionados anteriormente, ya que ayudan a la mantención de la flora intestinal benéfica (Fuller, 1989), y alteran el metabolismo bacteriano (Jin *et al.*, 1997), manteniendo un equilibrio del ecosistema intestinal por disminución de microorganismos dañinos como coliformes y algunos anaeróbios del género *Clostridium* (Line *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 1999; Shim *et al.*, 2010), y favorecen el desarrollo de los microorganismos beneficiosos, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La supresión de microorganismos nocivos finalmente se traduce en un mejor crecimiento y metabolismo de las bacterias benéficas potenciando el mejor desempeño productivo y la retención de nutrientes (Koenen *et al.*, 2004; Mountzouris *et al.*, 2007, 2010; An *et al.*, 2008).

Finalmente en el análisis morfométrico de duodeno en el día 22 sólo se observó un efecto de los probióticos sobre el ancho de las vellosidades, siendo el tratamiento T2, el cual mostró vellosidades más anchas. Sin embargo, para el día 42, se observó un efecto positivo sobre el largo de la mucosa en el tratamiento T1, y el largo de las vellosidades intestinales en T1 y T2, tal como lo han reportado otros autores, en pollos tratados con probióticos, a los cuales se les realizó el análisis morfométrico de intestino al día 35 de estudio (Sen *et al.*, 2012).

5. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, la incorporación de probióticos en el agua de bebida demostró tener un efecto promotor del crecimiento en pollos broiler Ross 308, aumentando el peso vivo y la ganancia de peso vivo hasta el día 30 de vida productiva de los animales, además de mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y el rendimiento cárnico. También generaron una disminución de ciertos microorganismos patógenos como coliformes y anaeróbios. Finalmente en el análisis morfométrico de duodeno al día 22, la dosis más alta de probióticos aumentó el ancho de las vellosidades intestinales, y el día 42, la mayor dosis (T2) incrementó el largo total de la mucosa, y ambas dosis de probióticos (grupos T1 y T2), aumentaron el largo de las vellosidades intestinales.

6. REFERENCIAS

- Abe, F., Uchijima, A., Miyauchi, H., Yaesima, T., Iwatsuki, K. (2009). Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International Journal of Dairy Technology*. 62, 234-239.
- An, B., Cho, B., You, S., Paik, H., Chang, H., Kim, S., Yun, C., Kang, C. (2008). Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast β -glucan and single-strain probiotics. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 21, 1027-1032.
- AOAC (1996). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16th ed.). Gaithersburg, USA: AOAC International.
- Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z. (2004). Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*. 83, 1093-1098.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M., Aranzazu, M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology RTP*. 45(1), 91-95.
- Boyle, E., Bishop, J., Grassl, G., Finlay, B. (2007). *Salmonella*: From pathogenesis to therapeutics. *Journal of Bacteriology*. 189(5), 1489-1495.
- Cavazzoni, V., Adami, A., Castrovilli, C. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British Poultry Science*. 39, 526-529.
- Cross, M. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 34, 245-253.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics — *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 26(6), 767-778.
- Czerucka, D., Rampal, P. (2002). Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*. 4(7), 733-739.
- De Basilio, V., Requena, F., León, A., Vilariño, M., Velasco, Z., Picard, M. (2002). Why does early thermal conditioning sometimes fail to improve the resistance of broilers to heat stress?. *Animal Research*. 51, 407-420.
- Fan, Y., Croom, J., Christensen, V., Black, B., Bird, A., Daniel, L., McBride, B., Eisen, E. (1997). Jejunal glucose uptake and oxygen consumption in turkey poults selected for rapid growth. *Poultry Science*. 76, 1738-1745.
- Farnell, M., Donoghue, A., De los Santos, F., Blore, P., Hargis, B., Tellez, G., Donoghue, D. (2006). Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poultry Science*. 85(11), 1900-1906.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In the joint fao/who expert consultation report on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria (October 2001).
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66, 365-378.
- Higgins, J., Higgins, S., Wolfenden, A., Henderson, S., Torres-Rodriguez, A., Vicente, J., Tellez, G. (2010). Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella enteritidis* in neonatal broilers. *Poultry Science*. 89(2), 243-247.
- Jin, L., Ho, H., Abdullah, N., Jalaludin, S. (1997). Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal*. 53, 352-368.
- Jin, L., Ho, H., Abdullah, N., Jalaludin, S. (2000). Digestive and bacteria enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*. 79, 886-891.
- Koenen, M., Kramer, J., Van Der Hulst, R., Heres, L., Jeurissen, S., Boersma, W. (2004). Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meatype chickens. *British Poultry Science*. 45, 355-366.

- La Ragione, R., Narbad, A., Gasson, M., Woodward, M. (2004). In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Letters in Applied Microbiology*. 38, 197-205.
- Line, E., Bailey, S., Cox, N., Stern, N., Tompkins, T. (1998). Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Science*. 77, 405-410.
- Maragkoudakis, P., Konstantinos, C., Psyras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M., Tsakalidou, E., (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*. 130, 219-226.
- Mountzouris, K., Tsistsikos, P., Kalamara, E., Nitsh, S., Schatzmayr, G., Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating caecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*. 86, 309-317.
- Mountzouris, K., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G., Fegeros, K. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and caecal microflora composition. *Poultry Science*. 89, 58-67.
- Modesto, M., D'Aimmo, M., Stefanini, I., Trevisi, P., De Filippi, S., Casini, L., Mazzoni, M., Bosi, P., Biavati, B., (2009). A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Science*. 122, 248-258.
- Morishita, T., Aye, P., Harr, B., Cobb, C., Clifford, J. (1997). Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Diseases*. 41, 850-855.
- Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J., Monfort, J., Garriga, M. (1999). *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4981-4986.
- Rahimi, G. (2005). Effect of heat shock at early growth phase on glucose and calcium regulating axis in broiler chickens. *International Journal of Poultry Sciences*. 4(10), 790-794.
- Samanya, M., Yamauchi, K. (2002). Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 133, 95-104.
- Schwartz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17, 431-437.
- Sen, L., Ingale, S., Kim, Y., Kim, J., Kim, K., Lohakare, J., Kim, E., Kim, H., Ryu, M., Kwon, I., Chae, B. (2012). Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science*. 93, 264-268.
- Shim, Y., Shinde, P., Choi, J., Kim, J., Seo, D., Pak, J., Chae, B., Kwon, I. (2010). Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 23, 521-529.
- Shu, Q., Qu, F., Gill, H. (2001). Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 33, 171-177.
- Simpson, P., Stanton, C., Fitzgerald, G., Ross, R. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 493-501.
- Téllez, G., Higgins, S., Donoghue, A., Hargis, B. (2006). Digestive physiology and the role of microorganisms. *The Journal of Applied Poultry Research*. 15(1), 136-144.
- Timmerman, H., Veldman, A., Van den Elsen, E., Rombouts, F., Beynen, A. (2006). Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*. 85, 1383-1388.

- Torres-Rodriguez, A., Donoghue, A., Donoghue, D., Barton, J., Tellez, G., Hargis, B. (2007). Performance and condemnation rate analysis of commercial turkey flocks treated with a *Lactobacillus* spp.-based probiotic. *Poultry Science*. 86(1), 444-446.
- Vicente, J., Torres-Rodriguez, A., Higgins, S., Pixley, C., Tellez, G., Donoghue, A., Hargis, B. M. (2008). Effect of a selected *Lactobacillus* spp-based probiotic on *Salmonella enteritidis*-infected broiler chicks. *Avian Diseases*. 52(1), 143-146.
- Vicente, J., Aviña, L., Torres-Rodriguez, A., Hargis, B., Tellez, G. (2007). Effect of a *Lactobacillus* spp-based probiotic culture product on broiler chicks performance under commercial conditions. *International Journal of Poultry Science*. 6(3), 154-156.
- Wang, Y., Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in Veterinary Science*. 89, 163-167.
- Williams, P. (2007). *Bacillus subtilis*: A shocking message from a probiotic. *Cell Host & Microbe*. 1(4), 248-249.
- Willis, W., Reid, L. (2008). Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Science*. 87, 606-611.
- Wolfenden, A., Vicente, J., Higgins, J., Andreatti, R., Higgins, S., Hargis, B., Tellez, G. (2007). Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 6(6), 403-405.