

01672

9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ALIMENTOS FUNCIONALES: MODIFICACION DE LA ECOLOGIA GASTROINTESTINAL DEL POLLO DE ENGORDA NEONATO CON LA INCLUSION DE UN PREBIOTICO EN LA DIETA.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTADA POR:

GERARDO MANUEL L NAVA MORALES

TUTORES:

BILLY M. HARGIS

GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

SERGIO GOMEZ ROSALES



MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACION

El autor da conocimiento a la División de Estudios de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad nacional Autónoma de México para que este ejemplar de tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

ATENTAMENTE

MVZ Gerardo Manuel Nava Morales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Juan Manuel Nava Reyes

Maria Eulogia Morales Ortíz

A MIS HERMANOS:

Noemi

Hector

Claudia

A MI TIA:

Catalina Franco Reyes

GRACIAS POR APOYARME SIEMPRE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A

"MI ALMA MATER"
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Departamento de Producción Animal: Aves

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DR GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

CONTENIDO	página
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	
Alimentos funcionales	6
Probióticos	9
Prebióticos	11
Alimentos funcionales suplementados con prebióticos: efectos en la fisiología del tracto intestinal	12
Importancia del uso de los alimentos funcionales en la nutrición del pollo de engorda	13
Hipótesis	18
Objetivos	18
Material y métodos	20
Resultados	
Efectos sobre la fisiología del tracto gastrointestinal	28
Efectos sobre la ecología del tracto intestinal	30
Discusión	32
Efecto sobre la fisiología del tracto gastrointestinal	33
Efecto sobre la ecología del tracto intestinal	39
Conclusión	43
Referencias	44
Tablas y figuras	57

Tablas	página
1. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos de engorda neonatos	I
2. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el peso corporal y la uniformidad del peso corporal (coeficiente de variación) en pollos de engorda neonatos	II
3. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el tamaño de la vellosidad de ileon a los 20 días de edad en pollos de engorda neonatos	III
4. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la concentración de cenizas, calcio y fósforo en tibias de pollos de engorda neonatos	IV
5. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta del contenido de ingluvies en pollos de engorda neonatos	V
6. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta del contenido de ciego en pollos de engorda neonatos	VI
7. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el pH del contenido de ingluvies y ciego en pollos de engorda neonatos	VII
8. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el grado de colonización e invasión a órganos internos por <i>Salmonella enteritidis</i> pollos de engorda neonatos	VIII
9. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el peso corporal de pollos de engorda neonatos alimentados con una dieta estresante	IX

Figuras	página
1. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la uniformidad del peso corporal a los 9 días de edad en pollos de engorda neonatos	X
2. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la uniformidad del peso corporal a los 16 días de edad en pollos de engorda neonatos	XI
3. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la uniformidad del peso corporal a los 27 días de edad en pollos de engorda neonatos	XII
4. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el la concentración de energía y proteína en el contenido de ileon de pollos de engorda neonatos	XIII
5. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el tamaño de la vellosidad de ileon a los 20 días de edad en pollos de engorda neonatos	XIV
6. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre el número más probable de microflora intestinal aeróbica	XV
7. Efecto de la administración del prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> en la dieta (alimento funcional) y in vitro, sobre el número más probable de lactobacilos en el contenido intestinal	XVI
8. Efecto de la administración del prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> en un cultivo de lactobacilos, sobre la síntesis de bacteriocinas in vitro	XVII
9. Efecto de la administración del prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> en un cultivo de lactobacilos, sobre la síntesis de bacteriocinas in vitro	XVIII
10. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de <i>Aspergillus</i> sobre la fisiología y ecología del tracto intestinal de pollos de engorda neonatos	XIX

Resumen

GERARDO MANUEL NAVA MORALES. Alimentos funcionales: modificación de la ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato con la inclusión de un prebiótico en la dieta. (Bajo la supervisión de DVM. MSc. PhD. Billy M. Hargis, MVZ. MC. PhD. Guillermo Téllez Isaías, MVZ. MC. PhD. Sergio Gómez Rosales).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la administración de un alimento funcional (AF) suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* (HA), sobre la fisiología y ecología gastrointestinal de pollos de engorda neonatos. Para este fin, se utilizaron dos dietas basales formuladas en base sorgo-soya: a). dieta control (grupo control) y b). dieta adicionada con 0.2% de HA (grupo AF). Estas dietas fueron administradas a las aves del día 1 al 30 de edad. El tiempo de tránsito gastrointestinal (TTG) fue evaluado a los 15 y 26 días de edad. El análisis morfométrico de la mucosa intestinal (ileon y ciego), pH del contenido intestinal de ingluvies y ciego, concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), utilización de proteína y energía (P-E) a nivel de ileon, concentración de minerales (cenizas, calcio y fósforo) y la exclusión de *Salmonella enteritidis* (SE) de órganos internos (tonsilas cecales, hígado y bazo) se realizó a los días 10, 20 y 30 de edad. El peso corporal (PC, días 9, 16 y 27 de edad), la uniformidad del peso corporal (UPC, días 9, 16 y 27 de edad), el número más probable de microflora intestinal aeróbica y anaeróbica en el contenido intestinal (día 20 de edad) y la síntesis de bacteriocinas (*in vivo* y *in vitro*, día 8 de edad) se realizó a diferentes días de edad. La administración del AF suplementado con HA aumento modificó significativamente la fisiología y ecología del tracto gastrointestinal. En el grupo AF, se observó un aumento en el TTG, el número total de UFC de microflora aeróbica (coliformes, hongos-levaduras y enterobacterias), anaeróbica (*Lactobacillus* sp) y una marcada reducción en el grado de invasión a órganos internos por SE, al comparar estos valores con el grupo control ($P < 0.05$). No se observaron diferencias entre grupos en el número total de CFU de *Clostridium* sp. La administración del AF aumentó el tamaño de la vellosidad de ileon al día 20 de edad. Este efecto no se observó en la mucosa de ciego. En la evaluación de pH de ingluvies no se observaron diferencias entre grupos a diferentes edades. Sin embargo, en el grupo del AF se observó un aumento en los valores de pH de ciego a los 20 días de edad. No se observaron diferencias significativas entre grupos en las concentraciones de AGCC en ingluvies y ciego. En el grupo AF al día 20 de edad se observó una aumento en el pH cecal y una aparente reducción en la concentración de AGCC de este órgano. Este efecto de menor concentración y aumento en los valores de pH ha sido relacionado con un aumento en la absorción intestinal de AGCC, mecanismo fisiológico "dependiente de la concentración". Las aves del AF presentaron una mejor utilización de la P-E en ileon y un aumento en la concentración de minerales en tibia al día 10 de edad. Durante y al final del experimento, no se observaron diferencias en PC. Sin embargo, el grupo del AF presentó la mejor UPC. La suplementación de HA favorece la síntesis de bacteriocinas por parte de la microflora benéfica del lumen intestinal. Los resultados del presente estudio describen los posibles mecanismos fisiológicos a través de los cuales la suplementación de HA en el alimento funcional favorece la ecología intestinal. Incluyendo un mejor desarrollo del tracto intestinal, desarrollo corporal y reducción de la infección por SE.

Palabras claves: Prebiótico, Ecología gastrointestinal, Harina de *Aspergillus*, Fisiología intestinal, Pollos de engorda.

Abstract

GERARDO MANUEL NAVA MORALES. Functional foods: Manipulating the gastrointestinal ecology in the neonate broiler chicks with *Aspergillus* meal prebiotic added in the diet. (Advisors: DVM. MSc. PhD. Billy M. Hargis, MVZ. MC. PhD. Guillermo Téllez Isaías, MVZ. MC. PhD. Sergio Gómez Rosales)

Gastrointestinal physiologic and ecologic effect of Functional food (FF) supplemented with *Aspergillus* meal prebiotic (AM) in neonate broilers diet was investigated. Two experimental basal sorghum-soybean diets: a). control diet (control group) and b). diet plus 0.2% of AM (FF group), were administrated from day 1 to 30 of age. Gastrointestinal transit time (GTT) was evaluated at days 15 and 26 of age. Morphometric analysis of intestinal mucosa (ileum and ceca), crop and cecal pH, short chain fatty acids (SCFA), protein and energy (P-E) in ileal digest, mineral content in tibia (ashes, calcium and phosphorus) and *Salmonella enteritidis* (SE) organ (cecal tonsils, liver and spleen) exclusion were evaluated at 10, 20, and 30 days old. Body weight (BW at 9, 16 y 27 days of age), BW uniformity (BWU, at 9, 16 y 27 days of age), gut aerobic and anaerobic microflora (20 days old), and bacteriocin synthesis (8 day old) were evaluated at different ages. Increases in the GTT, total CFU of aerobic (coliforms, mold-yeast, and enterobacteriaceae), anaerobic (*Lactobacillus*) microflora and a reduction on SE organ invasion were observed in the group fed with FF compared with control ($P < 0.05$). No differences were observed on total CFU of *Clostridium* between both groups. Dietary supplementation of AM in the FF increased the villi height in the ileum at 20 days, but no changes in ceca were observed. Although there were no differences on crop pH at any time of evaluation, an increase in cecal pH in FF group was observed at 20 days. No significant changes in crop SCFA were observed between groups at any time. Interestingly, at 20 days, a reduction of cecal SCFA concentrations was observed in the FF group. This effect and the alkalinity of cecal pH support the concept that absorption of SCFA may be concentration-dependent. Chicks fed with FF at day 10 showed the best P-E utilization in the ileum and an increase in mineral content in tibia. Dietary AM supplementation did not affect BW, but improved BWU. The results of the present study describe the possible physiological pathways by which dietary AM could be a good substrate for improving gastrointestinal ecology. These improvements include enhanced gut development, growth performance and reduction of SE infectivity.

Key words: Prebiotic, Gastrointestinal ecology, *Aspergillus* meal, Gastrointestinal physiology, Broiler chicken.

ALIMENTOS FUNCIONALES: MODIFICACIÓN DE LA ECOLOGÍA GASTROINTESTINAL DEL POLLO DE ENGORDA NEONATO CON LA INCLUSIÓN DE UN PREBIÓTICO EN LA DIETA

Introducción

Alimentos funcionales

En el pasado, el principal objetivo en el procesamiento de alimentos convencionales, era reducir o inactivar cualquier población microbiana presente en los alimentos terminados. Una de las principales metas de la industria de alimentos fue el desarrollo de productos estables, por lo que se requería de la utilización de procedimientos térmicos para la eliminación de las bacterias presentes en los productos. En la actualidad, la nueva era de los alimentos, demanda el desarrollo de “alimentos funcionales” y la introducción de los productos bióticos en la industria alimenticia.¹

Los recientes avances en biotecnología apoyan la hipótesis de que la dieta modula varias funciones importantes del organismo, además de proveer los nutrientes necesarios para el desarrollo de los individuos. Aquel viejo concepto de la nutrición enfocado en diseñar dietas ausentes de efectos adversos, ha sido modificado por la idea de diseñar dietas que promuevan el bienestar, una mejor salud y disminuir la presencia de enfermedades. En la última década, principalmente en Japón, Europa y los Estados Unidos, se han dado a la tarea de actualizar el concepto de la nutrición, con el desarrollo de alimentos funcionales.^{2,3}

Los alimentos funcionales son dietas con la apariencia de un “alimento convencional” que son consumidas como parte de una dieta normal, pero que han sido adaptadas

mediante varias estrategias para proporcionar beneficios fisiológicos y reducir el riesgo de enfermedades, además de poseer los efectos de nutrición tradicionales.^{1,4,5}

Para que un alimento pueda ser llamado "funcional" debe de cubrir uno de los siguientes dos criterios, 1) que alguno de sus componentes alimenticios (nutriente o no) genere efectos benéficos en una o varias funciones en el organismo. 2) generar un efecto fisiológico, más allá que el efecto nutricional tradicional.^{6,7}

En la actualidad, algunas de las estrategias para el desarrollo de los alimentos funcionales son:^{1,4,5,8,9}

1. La utilización de probióticos, que son microorganismos vivos que proporcionan un efecto benéfico para al hospedador. Hoy en día, se busca la selección de probióticos con funciones específicas.
2. La utilización de prebióticos, que son ingredientes o componentes de la dieta que tienen un efecto benéfico para la microflora intestinal.
3. La combinación de probióticos y prebióticos, llamada simbióticos.
4. El desarrollo de alimentos funcionales basados en la adición de ingredientes específicos que son dirigidos a una acción en particular. El ejemplo más común de esto, es la inclusión de ácidos grasos omega-3, o ácidos grasos polinsaturados.

Existen algunas diferencias en cuanto la terminología que se emplea en Europa y U.S.A. del concepto de "alimentos funcionales". Sin embargo, las dos regiones participan activamente en el desarrollo de estos productos. Se estima que esta industria crece anualmente del 15 al 20% y que se invierten más de 63 billones de dólares en el desarrollo de nuevos productos. En los U.S.A. este concepto se conoce con el nombre de "nutraceutica" y en Europa se utiliza el término "alimentos funcionales."^{4,10,11} Las principales recomendaciones de la comisión Europea para el desarrollo de Alimentos

funcionales: FUFOSE (Functional Food Science in Europe) para el desarrollo de alimentos funcionales son, a). los alimentos funcionales deben ser alimentos convencionales, utilizados en la alimentación diaria; b). se debe demostrar con bases científicas los efectos benéficos de los alimentos funcionales, además de los efectos nutricionales; c). deben promover el bienestar, la salud, mejorar la calidad de vida y disminuir el riesgo de enfermedades, además de cubrir los requerimientos nutricionales de los individuos y d). deben ser formulados exclusivamente con ingredientes naturales.⁴

Las investigaciones y el desarrollo de productos bióticos (probióticos, prebióticos, simbióticos, alimentos funcionales, etc.) se ha visto incrementada en los últimos años, debido a la evidencia de que estos productos proporcionan grandes beneficios en la salud de los individuos consumidores, incluyendo la resistencia a enfermedades, la actividad antibacteriana y desarrollo del sistema inmune⁹. El primer paso en el desarrollo de alimentos funcionales es la identificación y comprensión de los mecanismos de interacción entre el componente del alimento y la función corporal. En esta base, el efecto funcional puede ser definido y demostrado en modelos importantes, incluyendo estudios en nutrición humana⁴. La comisión Europea para el control de alimentos recomienda que los estudios para el desarrollo de productos bióticos se clasifiquen en tres categorías, 1. Fuertes, cuando se haya demostrado su efecto benéfico en humanos, 2. Prometedores, cuando no se haya comprobado en humanos, pero se están desarrollando investigaciones al respecto y 3. Preliminares, cuando hayan sido confirmados en animales.¹² Por lo tanto, el modelo animal es la base para el desarrollo de alimentos funcionales.

Entre los beneficios más importantes que promueven los alimentos funcionales hacia el organismo, se encuentra la función gastrointestinal, incluyendo en este, el control del tiempo de tránsito gastrointestinal, modificación de la microflora intestinal, modulación

de la motilidad y proliferación celular de la mucosa intestinal, modificación de la actividad inmunológica intestinal, regulación de la función endocrina del tracto intestinal, además de algunas funciones sistémicas que podrían ser la clave para el desarrollo de estos alimentos.^{5,13,14,15} Sin embargo, el papel de los prebióticos, probióticos y simbióticos necesita ser analizado a fondo para lograr el balance de la microflora intestinal y como conocer como participa esta, en el metabolismo del consumidor.⁴

Hoy en día, el uso indiscriminado de antibióticos y el dramático incremento de patógenos bacterianos resistentes, ha incrementado el interés de utilizar alimentos funcionales como una alternativa conjunta con la terapia antimicrobiana. El concepto "nutrición eco-inmune" ha surgido como una nueva herramienta para el tratamiento postoperatorio de pacientes intervenidos quirúrgicamente o que necesitan recobrar su microflora intestinal después de una prolongada terapia con antibióticos.^{16,17}

El uso de los alimentos funcionales en la alimentación humana se ha incrementado en los últimos años, de tal forma que el empleo de bacterias ácido lácticas en la elaboración de este tipo de alimentos representa el 25% de los componentes de la dieta humana. La suplementación en la dieta con este tipo de microorganismos benéficos, no solo se ha utilizado en la alimentación humana, sino además se ha empleado en la producción animal y en la agricultura.¹⁷

Probióticos

Un probiótico es definido como un suplemento alimenticio que contiene bacterias viables y que proporcionan efectos benéficos para el consumidor (huésped). Este concepto inicialmente fue utilizado en la alimentación animal. Sin embargo, desde mediados del siglo pasado, varias mezclas de microorganismos, especialmente

de la motilidad y proliferación celular de la mucosa intestinal, modificación de la actividad inmunológica intestinal, regulación de la función endocrina del tracto intestinal, además de algunas funciones sistémicas que podrían ser la clave para el desarrollo de estos alimentos.^{5,13,14,15} Sin embargo, el papel de los prebióticos, probióticos y simbióticos necesita ser analizado a fondo para lograr el balance de la microflora intestinal y como conocer como participa esta, en el metabolismo del consumidor.⁴

Hoy en día, el uso indiscriminado de antibióticos y el dramático incremento de patógenos bacterianos resistentes, ha incrementado el interés de utilizar alimentos funcionales como una alternativa conjunta con la terapia antimicrobiana. El concepto "nutrición eco-inmune" ha surgido como una nueva herramienta para el tratamiento postoperatorio de pacientes intervenidos quirúrgicamente o que necesitan recobrar su microflora intestinal después de una prolongada terapia con antibióticos.^{16,17}

El uso de los alimentos funcionales en la alimentación humana se ha incrementado en los últimos años, de tal forma que el empleo de bacterias ácido lácticas en la elaboración de este tipo de alimentos representa el 25% de los componentes de la dieta humana. La suplementación en la dieta con este tipo de microorganismos benéficos, no solo se ha utilizado en la alimentación humana, sino además se ha empleado en la producción animal y en la agricultura.¹⁷

Probióticos

Un probiótico es definido como un suplemento alimenticio que contiene bacterias viables y que proporcionan efectos benéficos para el consumidor (huésped). Este concepto inicialmente fue utilizado en la alimentación animal. Sin embargo, desde mediados del siglo pasado, varias mezclas de microorganismos, especialmente

Lactobacillus y *Streptococcus* han sido utilizadas en la elaboración de productos fermentados para promover la salud humana.^{8,16,18}

El término probiótico fue introducido en 1970 para describir así a todos los suplementos alimenticios de microorganismos proporcionado a hombres y animales. Posteriormente Fuller, define el término de probióticos como todo suplemento de microorganismos vivos que tienen un efecto benéfico en el animal hospedador debido a un mejoramiento en el balance de la microflora intestinal. Los probióticos utilizados en la alimentación animal incluyen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, levaduras como *Saccharomyces*, *Aspergillus* and *Turolopsis*.¹⁶ Algunos autores sugieren que los probióticos que introducen un nuevo género bacteriano al microambiente intestinal, son mas ventajosos que los que logran una rápida maduración o establecimiento de la microflora endémica. Por ejemplo, la administración de lactobacilus como probiótico en la alimentación de pollos y cerdos, genera una respuesta muy discreta, debido a que esta bacteria esta presente en un gran número en el tracto gastrointestinal de estos animales¹⁹, pero su uso en humanos ha sido exitoso,^{20,21} debido a que esta bacteria no es predominante en la microflora intestinal del hombre.²² Sin embargo, en estudios recientes se logrado proteger a pollos neonatos contra la infección por salmonela, con la administración profiláctica de probióticos provenientes de microflora intestinal de aves adultas.^{23,24} Esto sugiere que para el desarrollo de probióticos, es necesario estudiar a fondo la interacción entre los microorganismos endémicos de un ecosistema intestinal, así como también el posible efecto benéfico por la introducción de microflora intestinal proveniente de otra especie. Con el uso de probióticos, también ha demostrado que es posible regular algunas actividades fisiológicas del organismo hospedador, por ejemplo, a) incremento de la capacidad digestiva, 2) desarrollo de las defensas inespecíficas del tracto intestinal, 3) modulación de la inmunidad sistémica e intestinal, 4) mantenimiento de la mucosa

intestinal y 5) reducción de la inflamación y la presentación de alergias hacia los alimentos. Por estas acciones, los probióticos no solo son considerados como productos para mantener la funcionalidad del organismo, sino además como productos terapéuticos.^{1,16,17} En la actualidad, el uso potencial de los probióticos va encaminado a la modulación de la fisiología intestinal de los individuos.¹

Prebióticos

El término prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995²⁵ para describir a los suplementos alimenticios que no son digeribles por el hospedador y que generan efectos benéficos para la salud, estimulando selectivamente el desarrollo o la actividad de una o varias bacterias en el tracto intestinal.²⁵ Para que un ingrediente alimenticio pueda ser clasificado como prebiótico, debe: a) no ser hidrolizado o absorbido por el tracto intestinal; 2) ser un sustrato selectivo para una o varias bacterias benéficas habitantes del tracto intestinal, estimulando la proliferación y/o el metabolismo de las mismas y 3) este aumento en la actividad de la microflora intestinal, debe ser benéfico para el hospedador.²⁶

Las bacterias "alimentadas" por un sustrato específico (prebiótico), presentan la ventaja de una mayor proliferación comparada con el resto de las bacterias del tracto intestinal. Estudios *in vitro* e *in vivo* con prebióticos, han demostrado que algunos de estos tienen actividad bifidogénica, capacidad de reducir el pH del contenido intestinal, incrementar la producción de ácidos grasos volátiles, favorecer la síntesis de metabolitos bacterianos y restaurar la ecología intestinal en los individuos. Además, estos factores tienen la capacidad de regular el desarrollo de la mucosa intestinal.^{1,5,16,27,28}

Entre los efectos más importantes generados por la administración de prebióticos en la dieta, se encuentran:

intestinal y 5) reducción de la inflamación y la presentación de alergias hacia los alimentos. Por estas acciones, los probióticos no solo son considerados como productos para mantener la funcionalidad del organismo, sino además como productos terapéuticos.^{1,16,17} En la actualidad, el uso potencial de los probióticos va encaminado a la modulación de la fisiología intestinal de los individuos.¹

Prebióticos

El término prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995²⁵ para describir a los suplementos alimenticios que no son digeribles por el hospedador y que generan efectos benéficos para la salud, estimulando selectivamente el desarrollo o la actividad de una o varias bacterias en el tracto intestinal.²⁵ Para que un ingrediente alimenticio pueda ser clasificado como prebiótico, debe: a) no ser hidrolizado o absorbido por el tracto intestinal; 2) ser un sustrato selectivo para una o varias bacterias benéficas habitantes del tracto intestinal, estimulando la proliferación y/o el metabolismo de las mismas y 3) este aumento en la actividad de la microflora intestinal, debe ser benéfico para el hospedador.²⁶

Las bacterias "alimentadas" por un sustrato específico (prebiótico), presentan la ventaja de una mayor proliferación comparada con el resto de las bacterias del tracto intestinal. Estudios *in vitro* e *in vivo* con prebióticos, han demostrado que algunos de estos tienen actividad bifidogénica, capacidad de reducir el pH del contenido intestinal, incrementar la producción de ácidos grasos volátiles, favorecer la síntesis de metabolitos bacterianos y restaurar la ecología intestinal en los individuos. Además, estos factores tienen la capacidad de regular el desarrollo de la mucosa intestinal.^{1,5,16,27,28}

Entre los efectos más importantes generados por la administración de prebióticos en la dieta, se encuentran:

- Modulación de la fisiología intestinal, especialmente las funciones que se asocian con el balance de la microflora intestinal, las reguladas por la actividad endocrina de los órganos, las que dependen de la actividad inmune, el control de nutrientes, el tiempo de tránsito gastrointestinal y la motilidad intestinal.¹⁵
- Modulación hormonal, vía balance insulina/glucagon, producción de péptidos gastrointestinales o metabolismo de macronutrientes (especialmente carbohidratos y ácidos grasos).²

Alimentos funcionales suplementados con prebióticos: efectos en la fisiología del tracto intestinal

La idea de que los alimentos funcionales suplementados con productos bióticos tienen efectos benéficos en la salud de los individuos, es toda una línea de investigación a nivel mundial. Las universidades, compañías e institutos de investigación relacionadas en el área, dirigen toda su atención a investigar la modulación de la función del tracto intestinal a través de los alimentos funcionales.

Los mecanismos por los cuales los alimentos funcionales suplementados con prebióticos afectan la microecología del tracto intestinal, no han sido analizados a fondo en la actualidad, pero los mecanismos de acción que han sido observados son: 1) promueve el desarrollo de microflora benéfica; 2) favorece la producción de sustancias antibacteriales (bacteriocinas), que son secretadas por la microflora intestinal y que tienen un importante efecto sobre el control de la microflora gastrointestinal patógena; 3) estimulación de la respuesta inmune (títulos de anticuerpos, actividad de macrófagos, células T, interferón, interleucinas, placas de Peyer) en contra de patógenos intestinales; 4) competencia por receptores de la mucosa intestinal para la adhesión bacteriana; 5) mantiene la integridad de la mucosa intestinal; 6) reducción del fenómeno de translocación bacteriana; 7) mayor competencia por nutrientes y factores de

- Modulación de la fisiología intestinal, especialmente las funciones que se asocian con el balance de la microflora intestinal, las reguladas por la actividad endocrina de los órganos, las que dependen de la actividad inmune, el control de nutrientes, el tiempo de tránsito gastrointestinal y la motilidad intestinal.¹⁵
- Modulación hormonal, vía balance insulina/glucagon, producción de péptidos gastrointestinales o metabolismo de macronutrientes (especialmente carbohidratos y ácidos grasos).²

Alimentos funcionales suplementados con prebióticos: efectos en la fisiología del tracto intestinal

La idea de que los alimentos funcionales suplementados con productos bióticos tienen efectos benéficos en la salud de los individuos, es toda una línea de investigación a nivel mundial. Las universidades, compañías e institutos de investigación relacionadas en el área, dirigen toda su atención a investigar la modulación de la función del tracto intestinal a través de los alimentos funcionales.

Los mecanismos por los cuales los alimentos funcionales suplementados con prebióticos afectan la microecología del tracto intestinal, no han sido analizados a fondo en la actualidad, pero los mecanismos de acción que han sido observados son: 1) promueve el desarrollo de microflora benéfica; 2) favorece la producción de sustancias antibacteriales (bacteriocinas), que son secretadas por la microflora intestinal y que tienen un importante efecto sobre el control de la microflora gastrointestinal patógena; 3) estimulación de la respuesta inmune (títulos de anticuerpos, actividad de macrófagos, células T, interferón, interleucinas, placas de Peyer) en contra de patógenos intestinales; 4) competencia por receptores de la mucosa intestinal para la adhesión bacteriana; 5) mantiene la integridad de la mucosa intestinal; 6) reducción del fenómeno de translocación bacteriana; 7) mayor competencia por nutrientes y factores de

crecimiento bacterianos a nivel intestinal; 8) modificación de los nutrientes de la dieta por la microflora intestinal; 9) modificación de la actividad enzimática; 10) influencia en la permeabilidad de la mucosa, 11) reducción de factores carcinogénicos a nivel intestinal; 12) protección ante la infección de virus entéricos; 13) eliminación de sustancias tóxicas a nivel intestinal; 14) aumenta el tiempo de tránsito gastrointestinal; 15) favorece el metabolismo de lípidos, 16) disminuye el número de células aberrantes a nivel intestinal; 17) favorece la absorción de minerales y 18) reduce el riesgo a enfermedades crónicas (osteoporosis, aterosclerosis).^{3,8,17,29}

Importancia del uso de los alimentos funcionales en la nutrición del pollo de engorda

Existe una percepción muy interesante entre los nutriólogos del área avícola que menciona que la absorción de nutrientes es un factor limitante potencial en la supervivencia, desarrollo y conversión alimenticia de los pollos. Esta percepción ha sido reforzada por las ideas generadas en la última década acerca del desarrollo y función del sistema digestivo de las aves. Estas ideas se basan en los siguientes conceptos, 1) en el crecimiento durante los primeros días de vida es una prioridad para el ave desarrollar los "órganos de mantenimiento", como el sistema digestivo; para asegurar más tarde la demanda de los tejidos como los músculos, 2) la selección genética encaminada a un rápido crecimiento o reproducción ha alterado el sistema digestivo de las aves, a tal grado que los procesos digestivos no son desarrollados efectivamente en la edad temprana y 3) la selección genética no se ha desarrollado para encontrar un balance entre la función del sistema digestivo y la eficiencia energética. En conjunto estos conceptos explican la insuficiente capacidad del sistema gastrointestinal del pollo de engorda para absorber nutrientes, lo que genera algunos efectos negativos en la productividad y supervivencia.³⁰

crecimiento bacterianos a nivel intestinal; 8) modificación de los nutrientes de la dieta por la microflora intestinal; 9) modificación de la actividad enzimática; 10) influencia en la permeabilidad de la mucosa, 11) reducción de factores carcinogénicos a nivel intestinal; 12) protección ante la infección de virus entéricos; 13) eliminación de sustancias tóxicas a nivel intestinal; 14) aumenta el tiempo de tránsito gastrointestinal; 15) favorece el metabolismo de lípidos, 16) disminuye el número de células aberrantes a nivel intestinal; 17) favorece la absorción de minerales y 18) reduce el riesgo a enfermedades crónicas (osteoporosis, aterosclerosis).^{3,8,17,29}

Importancia del uso de los alimentos funcionales en la nutrición del pollo de engorda

Existe una percepción muy interesante entre los nutriólogos del área avícola que menciona que la absorción de nutrientes es un factor limitante potencial en la supervivencia, desarrollo y conversión alimenticia de los pollos. Esta percepción ha sido reforzada por las ideas generadas en la última década acerca del desarrollo y función del sistema digestivo de las aves. Estas ideas se basan en los siguientes conceptos, 1) en el crecimiento durante los primeros días de vida es una prioridad para el ave desarrollar los "órganos de mantenimiento", como el sistema digestivo; para asegurar más tarde la demanda de los tejidos como los músculos, 2) la selección genética encaminada a un rápido crecimiento o reproducción ha alterado el sistema digestivo de las aves, a tal grado que los procesos digestivos no son desarrollados efectivamente en la edad temprana y 3) la selección genética no se ha desarrollado para encontrar un balance entre la función del sistema digestivo y la eficiencia energética. En conjunto estos conceptos explican la insuficiente capacidad del sistema gastrointestinal del pollo de engorda para absorber nutrientes, lo que genera algunos efectos negativos en la productividad y supervivencia.³⁰

Con la selección genética no sólo se ha alterado la función del tracto gastrointestinal ave, sino además la forma del mismo. Dror *et al* demostró que el peso relativo del duodeno y yeyuno es mayor en aves ligeras que en aves seleccionadas por su rápido incremento de peso corporal.³¹ En otros estudios, Cherry *et al.* reportó que pollos seleccionados por presentar un peso corporal elevado, presentan un tracto gastrointestinal más pequeño con relación a su masa corporal, en comparación con las aves seleccionadas por presentar bajo peso corporal o white Leghorns.³²

Pero no sólo la función y tamaño del tracto gastrointestinal del ave se ha modificado con la selección genética, también se ha alterado la actividad enzimática digestiva. Se ha reportado que la actividad de la amilasa pancreática y quimiotripsina ha disminuido significativamente en razas ligeras en comparación con las razas pesadas. La secreción de enzimas digestivas podría ser un factor que limite la cantidad de alimento ingerido, digestión y el subsiguiente desarrollo de las aves.³⁰

Las aves jóvenes tienen una capacidad limitada para absorber las grasas, Krogdahl y Sell demostraron que las grasas vegetales y animales no son eficientemente aprovechadas hasta el momento en que la actividad de la lipasa pancreática esta en su máximo nivel, que es entre los días 40 y 56 de edad.³³

Otro factor que afecta la digestibilidad de nutrientes es la viscosidad del contenido intestinal y este se relaciona directamente con el tiempo de tránsito gastrointestinal. Existe una gran variedad de factores que pueden alterar en el proceso del tránsito a través del tracto gastrointestinal, como las grasas, las drogas, la obstrucción ileal, la irradiación, el grado de excitación, la edad, la temperatura ambiental, el genotipo, la cantidad de alimento consumido, la composición de la dieta y la microbiota intestinal. En la actualidad se sabe, que la dieta es el factor más importante que afecta el tránsito de la digesta a través del tracto gastrointestinal³⁴ y que los cambios en este flujo podrían generar modificación en el metabolismo de nutrientes en el lumen intestinal Dänicke *et*

a/ observó que el incremento en la viscosidad del contenido intestinal promueve la proliferación de ciertos géneros bacterianos a nivel intestinal y que estos microorganismos podrían contribuir a la digestibilidad y reciclamiento de amino ácidos a nivel cecal.³⁵

La microflora nativa intestinal desempeña un papel muy importante no sólo en la digestión de algunos nutrientes de la dieta del ave, sino además de inhibir la colonización de patógenos entéricos. Los niveles de población de esta microflora normal intestinal, las especies de microorganismos que forman las microcomunidades y la función genética y bioquímica de estos, probablemente estén regulados por procesos interactivos multifactoriales.^{36,37,38} Algunos de los procesos que influyen en la formación de comunidades pueden ser ejercidos por los tejidos del animal hospedador, calidad del alimento, drogas y medio ambiente.^{38,39,40}

Cuando se utilizan alimentos funcionales en la alimentación animal, se mejora la productividad de las especies. Esto se logra al modificar la ecología gastrointestinal y promover el mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta, además de disminuir la cantidad de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal al generarse un ambiente restrictivo por la producción de metabolitos bacterianos secundarios, por la producción de ácidos orgánicos, por la disminución del pH intestinal y por la producción de sustancias bactericidas. Se ha observado que la aplicación de cultivos de microflora normal intestinal en las aves recién nacidas, facilita el rápido establecimiento de la microflora en el tracto intestinal, manteniendo un buen estado de salud en las aves y con esto un incremento en los parámetros de producción.⁴¹ El establecimiento de esta microflora normal intestinal en el sistema digestivo del ave, siempre está relacionado con un incremento en la concentración de ácidos orgánicos y la subsiguiente disminución en el pH intestinal, pero además se han observado cambios estructurales e

histológicos en la mucosa cecal.^{27,42,43,44,45,46} Lupton *et al.*,⁴⁷ sugiere que la fermentación de carbohidratos no digeribles en el intestino grueso del ave, pueden ser un factor importante en la determinación de la proliferación de las células de la mucosa intestinal.⁴⁷ Estos cambios en la mucosa intestinal han sido asociados con un buen estado de salud y con un incremento de los parámetros productivos del ave. Algunos autores han reportado que en cerdos, las vellosidades y criptas intestinales de tamaño pequeño, están relacionadas con una pobre absorción de nutrientes.⁴⁸ Bi Yu *et al.*, demostró un aumento significativo en los parámetros productivos de pollos de engorda en el periodo crítico de desarrollo (0 a 3 semanas), al administrar probióticos a pollos de un día de edad.⁴¹ También se ha observado que la suplementación de ácidos grasos puede incrementar los parámetros de producción en gallinas de postura.⁴⁹

La intensa selección genética a la que el pollo de engorda ha sido sometido en las últimas cinco décadas, ha resultado en una selección indirecta desfavorable, donde la presentación de problemas se ha visto aumentada, principalmente los de tipo fisiológico.^{30,50,51,52} En los últimos años, ha aumentado el interés de los nutriólogos y fisiólogos avícolas para combatir las limitaciones del tracto gastrointestinal en los procesos físicos y químicos de la digestión y absorción de nutrientes.³⁰ Hoy en día se sabe que la digestión y absorción de nutrientes en las primeras horas de vida del pollo recién nacido, son dos funciones detrimentales para su sobrevivencia y desarrollo, no solo en las primera semana de vida, sino durante todo el ciclo de producción.^{30,51,53,54,55}

En los últimos cinco años, se han realizado una gran cantidad estudios para mejorar la calidad de los nutrientes y las dietas que se ofrecen a las aves de producción, el uso de enzimas (fitasa, xilasa, proteasa, etc) y otros aditivos (ácidos orgánicos, levaduras, carbohidratos complejos) se ha implementado como una práctica cotidiana en algunos alimentos. Sin embargo, hasta el momento no se conoce el mecanismo exacto de

acción, ni el impacto que tiene el uso de estos aditivos sobre el sistema gastrointestinal del pollo de engorda.

De aquí la importancia de desarrollar un modelo de estudio (*in vivo* e *in vitro*) para tratar de entender algunos de los factores que alteran la fisiología gastrointestinal, la absorción de nutrientes y el desarrollo de una ecología intestinal "funcional", para entender el papel que juega la microflora intestinal en la nutrición y la salud de los animales y desarrollar alimentos funcionales para remediar las posibles limitaciones.

Hipótesis

La administración de un alimento funcional suplementado con un prebiótico (harina de *Aspergillus*) puede modificar la fisiología y ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato y con esto mejorar los parámetros de producción.

Objetivo general

Modificar la fisiología y ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato con la administración de un alimento funcional suplementado con un prebiótico (harina de *Aspergillus*) y conocer la importancia de la microflora intestinal en la nutrición y salud de las aves.

Objetivos específicos

- 1) Se determinó por medio de una prueba biológica, un modelo para evaluar el tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos de engorda neonatos.
- 2) Se realizó por medio de una prueba biológica, un modelo para el análisis morfométrico de la mucosa intestinal de pollos de engorda neonatos.
- 3) Se determinó por medio de una prueba biológica el efecto de un alimento funcional en la exclusión de microorganismos patógenos en pollos de engorda neonatos.
- 4) Se evaluó por medio de una prueba biológica el efecto de un alimento funcional en la digestión y absorción de nutrientes (proteína y energía) de la dieta en pollos de engorda neonatos.
- 5) Se determinó por medio de una prueba biológica el número más probable de unidades formadoras de colonias de microflora intestinal en el contenido intestinal de pollos de engorda neonatos.

Hipótesis

La administración de un alimento funcional suplementado con un prebiótico (harina de *Aspergillus*) puede modificar la fisiología y ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato y con esto mejorar los parámetros de producción.

Objetivo general

Modificar la fisiología y ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato con la administración de un alimento funcional suplementado con un prebiótico (harina de *Aspergillus*) y conocer la importancia de la microflora intestinal en la nutrición y salud de las aves.

Objetivos específicos

- 1) Se determinó por medio de una prueba biológica, un modelo para evaluar el tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos de engorda neonatos.
- 2) Se realizó por medio de una prueba biológica, un modelo para el análisis morfométrico de la mucosa intestinal de pollos de engorda neonatos.
- 3) Se determinó por medio de una prueba biológica el efecto de un alimento funcional en la exclusión de microorganismos patógenos en pollos de engorda neonatos.
- 4) Se evaluó por medio de una prueba biológica el efecto de un alimento funcional en la digestión y absorción de nutrientes (proteína y energía) de la dieta en pollos de engorda neonatos.
- 5) Se determinó por medio de una prueba biológica el número más probable de unidades formadoras de colonias de microflora intestinal en el contenido intestinal de pollos de engorda neonatos.

- 6) Se analizó por medio de una prueba biológica, un modelo *in vitro* para evaluar la síntesis de metabolitos bacterianos de microflora intestinal aislada a partir de contenido intestinal de pollos de engorda neonatos.
- 7) Se determinó por medio de una prueba biológica, un modelo para determinar la uniformidad de pesos de pollos de engorda neonatos.
- 8) Se aisló una cepa de *Lactobacillus* sp productora de bacteriocinas.
- 9) Se determinó por medio de una prueba biológica, un modelo *in vitro* para evaluar el efecto de los prebióticos en síntesis de metabolitos bacterianos secundarios
- 10) Se estableció un modelo animal para evaluar el efecto de un alimento funcional sobre la fisiología y ecología del tracto gastrointestinal.

Material y Métodos

Determinación del tiempo de tránsito gastrointestinal (TTG).- El TTG se determinó mediante la diferencia de la presentación del marcador por vía oral y la primera observación del marcador en las excretas. Se utilizó óxido férrico (200 mg/kg PV) en una cápsula de gelatina y se administró por vía oral a diferentes periodos de tiempo. Las aves se colocaron en un corral con cama limpia y después de 2 horas postadministración del marcador, los animales fueron observados continuamente.³⁴

Determinación del peso corporal (PC).- Para calcular el peso promedio de las aves en cada tratamiento, todas las aves de cada grupo fueron pesadas en una balanza digital y los pesos expresados en gramos fueron registrados en cada día de evaluación.

Determinación de la uniformidad de los pesos corporales (UPC).- Para determinar la UPC, se calcularon las curvas de la distribución de la población con los pesos corporales obtenidos cada semana de cada ave. Además, se calculó la variabilidad del peso corporal, a través del porcentaje del coeficiente de variación como medida de uniformidad.⁵⁶

Determinación la utilización de nutrientes.- Para la estimar la utilización de nutrientes, se analizó el porcentaje de proteína (PP) y calorías de energía (CE) presente en el contenido intestinal del ileon (CI). Para este fin, se sacrificaron las aves por dislocación cervical y se tomó una muestra de contenido intestinal a 5 cm de la porción proximal de la unión íleo-cecal para determinar por el método de análisis químico proximal la contracción de proteína y calorías.⁵⁷

Determinación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).- Para determinar la concentración de AGCC totales, se colectó una muestra de 0.4 gramos de contenido intestinal que fueron suspendidos en 3.6 ml de agua destilada estéril. La concentración de AGCC total en el contenido cecal o ingluvies se determinó colectando sobrenadante de la suspensión preparada y analizado con equipo de cromatografía de gases con un detector ionizador de flama y un integrador de perfiles, técnicas descritas por Corrier et.al⁵⁸ y Rolfe⁵⁹

Determinación del pH del contenido intestinal.- Las evaluaciones del pH de contenido de intestinal, se realizó inmediatamente después de que las aves fueron sacrificadas. La lectura del pH del contenido intestinal se realizó insertando un electrodo de vidrio (Orion Research ionalizer/501; Orion Research Inc., Boston, Mass) dentro del contenido intestinal.⁴⁵

Análisis morfométrico de la mucosa intestinal (AMMI).- Inmediatamente después del sacrificio, se colectaron muestras de porciones de aproximadamente 3 cm de ileon y ciego que fueron fijadas en solución de formalina amortiguada al 10%. Estas muestras fueron procesadas con las técnicas de rutina de histología. Secciones (~5 μ m) fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos fueron evaluados en un microscopio óptico. El largo de las vellosidades fue medido con una cuadrícula micrométrica y se evaluó la mucosa en 5 puntos diferentes seleccionados al azar.⁶⁰

Determinación de la concentración de minerales en tibia.- Se colectaron las tibias derechas de las aves sacrificadas y se evaluó el porcentaje de cenizas (Pcen), calcio (Pcal) y fósforo (Pfos). Las muestras fueron secadas a 100 C durante 24 hr y posteriormente pesadas y colocadas en una estufa a 600 C durante toda la noche para

la determinación de cenizas. El Pcen, Pcal y Pfos fue determinado siguiendo los procedimientos de AOAC (1990).⁶¹

Determinación de la exclusión de patógenos gastrointestinales (EPG).- A los días 10 y 20 de edad, 20 pollos de cada tratamiento fueron desafiados vía oral con 10^8 UFC de *Salmonella enteritidis* (SE) resistente a novobiocina (NO) y al ác. Nalidixico (AN). Todos los pollos desafiados fueron sacrificados a las 24 horas pos-desafío para intentar el aislamiento de SE (resistente a NO-AN) de órganos internos siguiendo la metodología descrita por Téllez *et al.*, 1993.⁴⁵

Preparación del inóculo.- La cepa de desafío fue un aislamiento primario de SE resistente a NO-AN^A obtenido en el laboratorio del Departamento de Producción Animal (DPA): Aves. El cultivo se mantuvo en un medio de cultivo que contenía 25 μ g de NO y 20 μ g de AN / ml. El inóculo de desafío se preparó a partir de un cultivo de 18 hrs en caldo tripticasa soya^B. La concentración del inóculo fue determinada mediante espectrofotometría^C a razón de 10^9 ufc/1.0 ml, a partir de la cual se realizaron diluciones décuples seriadas en solución salina fosfatada amortiguadora (PBS por sus siglas en inglés) estéril, para lograr una concentración de 10^6 ufc /1.0 ml. Se confirmó la concentración de células viables del inóculo de desafío mediante conteo de colonias en placas de agar verde brillante (AVB)^D. Los medios empleados para cultivar el aislamiento precedente de los pollos desafiados en el estudio experimental, contenía 25 μ g de NO y 20 μ g de AN / ml. con la finalidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias no resistentes a estos antibióticos.²⁴

^A SIGMA Chemical C.O. St. Louis MO, U.S.A.

^B DIFCO Laboratories, Detroit MI. U.S.A.

^C Milton Roy Spectronic 20D, Milton Roy company, U.S.A.

^D MERCK KGaA, Darmstadt, Germany.

Determinación del número más probable de unidades formadoras de colonias de microflora intestinal anaeróbica.- Para determinar el número mas probable (NMP) de microflora intestinal anaeróbica, 1 gr de contenido intestinal fue diluido en 9 ml de solución amortiguadora reducida en una cámara de anaerobiosis, se realizaron diluciones décuples seriadas y se cultivó en placas de agar Reinforced Clostridium Medium Enriquecido, medio de cultivo formulado para cultivar microorganismos anaeróbicos. Las placas de agar fueron incubadas 72 horas a 37 C bajo condiciones de anaerobiosis. Los medios de cultivo fueron examinados y las diferentes colonias de diferentes tipos fueron contadas.⁶²

Determinación del número más probable de unidades formadoras de colonias de microflora intestinal aeróbica.- Para determinar el NMP de microflora intestinal aeróbica, 1 gr de contenido intestinal fue diluido en caldo tioglicolato⁶, se realizaron diluciones décuples seriadas y se cultivó en medios específicos para cada género bacteriano, se utilizó agar MacConkey⁶ para el aislamiento de coliformes, agar Sabourod dextrosa⁷ para el aislamiento de hongos y levaduras, agar Tergitol 7⁷ para el aislamiento de enterobacterias y agar SPS⁷ para el aislamiento de *Clostridium sp.* Las placas de agar fueron incubadas 24 horas a 37 C bajo condiciones de aerobiosis. Los medios de cultivo fueron examinados y las diferentes colonias de diferentes tipos fueron contadas.⁶³

Determinación de la producción de metabolitos bacterianos secundarios.- Para determinar el efecto de la dieta basal o el alimento funcional sobre la producción de metabolitos secundarios, se realizó el aislamiento del NMP de microflora intestinal

⁶ Bioxon México, Oaxaca; Mex.

⁶ Acumedia, Baltimore; USA

láctica en un medio específico (MRS, Difco, USA) para *Lactobacillus* sp, en condiciones de anaerobiosis. Las colonias aisladas, fueron desafiadas con microorganismos patógenos, siguiendo la metodología descrita por Gómez et al.⁶⁴

Determinación in vitro de la síntesis de bacteriocinas (SB).- Para evaluar la SB, se cultivó la cepa de *Lactobacillus* sp aislada de intestino de pollo en medio de cultivo MRS a 37 C, durante 24 hr en condiciones de anaerobiosis. Después del tiempo de incubación, las bacteriocinas producidas por la cepa de *Lactobacillus* sp fueron recuperadas de acuerdo a la técnica descrita por Dabard et al., (2001).⁶⁵

Animales de experimentación.- En cada prueba biológica se utilizaron pollos de engorda (Arbor acres x Arbor acres) de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial. Los pollos y muestras de cama y alimento fueron enviadas al laboratorio de microbiología para descartar la presencia de *Salmonella* spp.⁶⁶ Los pollos fueron alojados en baterías eléctricas, en una de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México o en las unidades de aislamiento del Departamento de Ciencias Avícolas (Poultry Science Department) de la Universidad de Texas A&M, en Texas USA.

Dietas basales.- Los pollos de engorda fueron alimentados desde el día de edad y hasta el final del experimento con una dieta basal de iniciación para pollo de engorda y fueron formuladas en base a granos de sorgo-soya. Las dietas fueron isocalóricas e isoproteicas, en la formulación no se incluyeron antibióticos o anticoccidianos y se

⁷ Difco, Detroit; USA.

balancearon de acuerdo a las recomendaciones del NRC, (1994).⁶⁷ El alimento y el agua se proporcionó *ad libitum* en todos los grupos.

Prebiótico harina de *Aspergillus* (HA).- Es un producto no tóxico de la fermentación primaria de una cepa de *Aspergillus* sp. Este prebiótico esta compuesto de un 45% de fibra de origen micelial y 12% de proteína.

Diseños experimentales

Experimento I (UNAM).- Para determinar el efecto del alimento funcional (AF) durante las primeras tres semanas de vida, se evaluó el TTG, PC, UPC, PP y CE en el CI, concentración de AGCC en ingluvies y ciego, pH de contenido de igluvies y ciego, AMMI de ileon y ciego, Pcen, Pcal, Pfos en tibia y la EPG (SE), se asignaron grupos de 30 aves cada uno con 2 réplicas para cada tratamiento (n=120) los diferentes tratamientos fueron, A). Dieta basal (grupo control), B). Dieta basal + 0.2% de prebiótico HA. El TTG se evaluó a los días 15 y 26 de edad. La determinación del PC y UPC se realizó a los 1, 9, 16 y 27 días de edad y el resto de los parámetros intestinales se evaluaron a los días 10, 20 y 30 de edad. La EPG solamente fue evaluada a los días 10 y 20 de edad.

Experimento II (UNAM).- Para determinar el efecto del AF bajo condiciones de estrés (dieta estresante y desafió con coccidia) sobre la microfora intestinal aeróbica y *Clostridium* sp, al día 20 de edad, se evaluó el NMP de microflora intestinal aeróbica y *Clostridium* sp. Se asignaron grupos de 25 aves cada uno con 2 réplicas para cada tratamiento (n=100) los diferentes tratamientos fueron, A). Dieta estresante (grupo control), B). Dieta estresante + 0.2% de prebiótico HA (grupo AF). La dieta estresante se administró desde el día uno de edad hasta el final de la prueba, fue una dieta base trigo-soya, formulada alta en trigo (40%). Al día 13 de edad todas las aves fueron desafiados

con *Eimeria acervulina* (5.0×10^4), *Eimeria maxima* (2.0×10^3) y *Eimeria tenella* (2.0×10^4). A los 20 días de edad, se sacrificaron 10 aves por tratamiento para evaluar NMP de microflora intestinal aeróbica y *Clostridium* sp a partir de contenido intestinal de ileon. Todas las aves de cada grupo fueron pesadas a los días 5, 12, 19 y 26 de edad.

Experimento III (Texas A&M).- Para determinar el efecto del AF sobre el la microflora intestinal benéfica y la producción de metabolitos secundarios (bacteriocinas), se evaluó el NMP microflora intestinal anaeróbica del género *Lactobacillus* y la síntesis de bacteriocinas. Se utilizaron dos aves de cada tratamiento como donadoras para determinar el NMP de microflora intestinal anaeróbica del *Lactobacillus* sp de 2 aves por cada tratamiento. Los diferentes tratamientos fueron, A). Dieta basal (grupo control) y B). Dieta basal + 0.2% de prebiótico HA (Grupo AF). El aislamiento de los microorganismos intestinales se realizó a los 8 días de edad. Las colonias de *Lactobacillus* fueron desafiadas con cepas patógenas de SE, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (O157:H7). La evaluación de la zona de inhibición de realizó 24 hr después del desafío.

Experimento IV (Texas A&M).- Para determinar el efecto del prebiótico AM en la SB, se evaluó la producción de lactobacinas (bacteriocinas producidas por el género *Lactobacillus*) en el modelo *in vitro*. Los diferentes tratamientos fueron, A). Medio MRS (grupo control) y B). Medio MRS + prebiótico HA. Las lactocinas fueron desafiadas *Escherichia coli* (O157:H7). La evaluación de la zona de inhibición de realizó 24 hr después del desafío.

Análisis estadístico. Las diferencias entre TTGI, PC, UPC, PP y CE en el CI, concentración de AGCC en ingluvies y ciego, PHI, pHC, AMMI de ileon y ciego, Pcen,

Pcal y Pfos en tibia, NMP de microorganismos y zonas de inhibición fueron determinadas análisis de varianza usando un Modelo General Linear.⁶⁸ Las diferencias entre grupos fueron determinadas usando un rango múltiple de Duncan. Estas evaluaciones se realizaron con un software comercial de SAS[®].⁶⁹ Para determinar las diferencias entre grupos en los porcentajes de colonización de SE en órganos internos, se empleo una prueba de Ji-cuadrada.⁷⁰

Resultados

Análisis bacteriológico de cama de transporte, alimento y aves.- Las muestras de cama, alimento y órganos (hígado, bazo y saco vitelino) de los pollos enviadas al laboratorio de microbiología, resultaron negativos al aislamiento de *Salmonella* spp.

Para presentar los resultados de los cambios en la fisiología y ecología del tracto intestinal por la administración de las diferentes dietas, los resultados del presente trabajo se dividieron en dos partes:

- a). Efectos sobre la fisiología del tracto gastrointestinal.
- b). Efectos sobre la ecología del tracto intestinal.

a). Efectos sobre la fisiología del tracto gastrointestinal

La administración del alimento funcional (AF) suplementado con un prebiótico en pollos de engorda neonatos de un día de edad, modificó la fisiología del tracto gastrointestinal.

Experimento I

Tránsito gastrointestinal

La administración del AF provocó un tránsito gastrointestinal más lento, comparado con el TTG del grupo control a los días 15 y 26 de edad. Sin embargo, al día 26 de edad, el efecto fue más marcado ($p < 0.05$) en grupo del AF (suplementado con el prebiótico HA) (Tabla 1).

Resultados

Análisis bacteriológico de cama de transporte, alimento y aves.- Las muestras de cama, alimento y órganos (hígado, bazo y saco vitelino) de los pollos enviadas al laboratorio de microbiología, resultaron negativos al aislamiento de *Salmonella* spp.

Para presentar los resultados de los cambios en la fisiología y ecología del tracto intestinal por la administración de las diferentes dietas, los resultados del presente trabajo se dividieron en dos partes:

- a). Efectos sobre la fisiología del tracto gastrointestinal.
- b). Efectos sobre la ecología del tracto intestinal.

a). Efectos sobre la fisiología del tracto gastrointestinal

La administración del alimento funcional (AF) suplementado con un prebiótico en pollos de engorda neonatos de un día de edad, modificó la fisiología del tracto gastrointestinal.

Experimento I

Tránsito gastrointestinal

La administración del AF provocó un tránsito gastrointestinal más lento, comparado con el TTG del grupo control a los días 15 y 26 de edad. Sin embargo, al día 26 de edad, el efecto fue más marcado ($p < 0.05$) en grupo del AF (suplementado con el prebiótico HA) (Tabla 1).

Peso corporal

En este experimento, no existió diferencia ($p>0.05$) entre los PC de los dos grupos a los días 1, 9, 16 y 27 de evaluación (Tabla 2). Sin embargo, al evaluar la UPC, el grupo del AF presentó una mejor uniformidad ($p<0.05$) que el grupo control durante todo el desarrollo del experimento (Tabla 2 y Figuras 1, 2, 3).

Utilización de nutrientes

El PP y CE en el CI se vio afectado por las diferentes dietas administradas. En las aves alimentadas con el AF, aparentemente se encontró una menor concentración de proteína y energía en el lumen intestinal. El grupo del AF, presentó la menor concentración de proteína y energía en el CI durante todas las evaluaciones de este experimento (Figura 4).

Desarrollo de la mucosa intestinal

En el AMMI al día 10 de edad, no se presentaron cambios ($p>0.05$) en el desarrollo de la mucosa intestinal de ileon y ciego. Sin embargo, al día 20 de edad, en el AMMI en las aves del grupo AF se observó un mejor desarrollo ($p<0.05$) de la mucosa intestinal (vellosidades masa largas) del ileon comparado con el grupo control. En el grupo AF el tamaño de la vellosidad del ileon al día 20 de edad, fue 95.7% más larga que la vellosidad del ileon del grupo control (Tabla 3 y Figura 5). No hubo diferencias ($p>0.05$) en el en el AMMI del ciego al día 20 de edad y del ileon y ciego al día 30 de edad.

Deposición de minerales en hueso

La administración del AF mejoró ($p<0.05$) en los primeros días de edad, la cantidad de minerales depositados en hueso. Al día 10 de edad, en el grupo del AF se observó un

mayor Pcen, Pcal y Pfos en tibia que en el grupo control (Tabla 4). Al día 20 de edad no se presentaron diferencias ($p>0.05$) en el Pcen y Pfos. Sin embargo, el Pcal fue mayor en el grupo control (Tabla 4). Al día 30 de edad en el grupo control se observaron los valores más altos de Pcen, Pcal y Pfos (Tabla 4).

b). Efectos sobre la ecología del tracto intestinal

La administración del alimento funcional (AF) suplementado con un prebiótico en pollos de engorda neonatos de un día de edad, modificó la fisiología del tracto gastrointestinal.

Experimento I

Actividad de la microflora intestinal

Al evaluar la concentración total de AGCC, no se apreciaron cambios significativos a los días 10, 20 y 30 de edad ($p>0.05$) en la concentración de estos metabolitos en el lumen del ingluvies o del ciego (Tablas 5 y 6). En general, el grupo alimentado con el AF presentó una aparente disminución en la concentración de AGCC totales en ciego a partir del día 20 de edad (Tabla 6).

En las evaluaciones del pH en el contenido del ingluvies (días 10, 20 y 30 de edad) y en las del contenido cecal (días 10 y 30 de edad) no se observaron diferencias ($p>0.05$) entre los dos tratamientos (dieta control y AF). Sin embargo, al día 20 en el grupo del AF se observó un aumento ($p<0.05$) en los valores del pH del contenido cecal (Tabla 7).

Colonización de órganos internos por Salmonella enteritidis

La administración del AF redujo ($p<0.05$) el grado de colonización de SE a órganos internos (hígado y bazo) a los días 10 y 20 de edad. No hubo diferencias significativas ($p>0.05$) en el grado de colonización por SE a tonsilas cecales entre los dos grupos

mayor Pcen, Pcal y Pfos en tibia que en el grupo control (Tabla 4). Al día 20 de edad no se presentaron diferencias ($p>0.05$) en el Pcen y Pfos. Sin embargo, el Pcal fue mayor en el grupo control (Tabla 4). Al día 30 de edad en el grupo control se observaron los valores más altos de Pcen, Pcal y Pfos (Tabla 4).

b). Efectos sobre la ecología del tracto intestinal

La administración del alimento funcional (AF) suplementado con un prebiótico en pollos de engorda neonatos de un día de edad, modificó la fisiología del tracto gastrointestinal.

Experimento I

Actividad de la microflora intestinal

Al evaluar la concentración total de AGCC, no se apreciaron cambios significativos a los días 10, 20 y 30 de edad ($p>0.05$) en la concentración de estos metabolitos en el lumen del ingluvies o del ciego (Tablas 5 y 6). En general, el grupo alimentado con el AF presentó una aparente disminución en la concentración de AGCC totales en ciego a partir del día 20 de edad (Tabla 6).

En las evaluaciones del pH en el contenido del ingluvies (días 10, 20 y 30 de edad) y en las del contenido cecal (días 10 y 30 de edad) no se observaron diferencias ($p>0.05$) entre los dos tratamientos (dieta control y AF). Sin embargo, al día 20 en el grupo del AF se observó un aumento ($p<0.05$) en los valores del pH del contenido cecal (Tabla 7).

Colonización de órganos internos por Salmonella enteritidis

La administración del AF redujo ($p<0.05$) el grado de colonización de SE a órganos internos (hígado y bazo) a los días 10 y 20 de edad. No hubo diferencias significativas ($p>0.05$) en el grado de colonización por SE a tonsilas cecales entre los dos grupos

(control y AF) a los 10 y 20 días de edad, ni en la colonización a órganos internos y tonsilas cecales al día 30 de edad (Tabla 8).

Experimento II

Poblaciones bacterianas aeróbicas en el lumen intestinal

En el grupo de aves que recibió el AF se observó un aumento ($p < 0.05$) en el NMP (UFC, unidades formadoras de colonia) de microorganismos aeróbicos (coliformes, hongos-levaduras y enterobacterias). Sin embargo, el número de UFC de *Clostridium* sp no se modificó por la administración del AF (Figura 6). La dieta suplementada con el prebiótico HA (AF) generó los mejores pesos ($p < 0.05$) al final de la prueba (Tabla 9).

Experimento III

Poblaciones bacterianas anaeróbicas (Lactobacillus sp) en el lumen intestinal

La administración del AF favoreció el desarrollo de UFC de *Lactobacillus* sp en el tracto intestinal de los pollos de engorda (Figura 7). Todas las cepas de *Lactobacillus* sp aisladas del tracto intestinal inhibieron el crecimiento de SE, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (O157:H7) *in vitro* (Figura 8).

Experimento IV

Producción de Lactobacinas in vitro

Se observó un aumento ($p < 0.05$) en el tamaño de la zona de inhibición en las placas de agar con *E. coli*, desafiadas con las lactobacinas provenientes de los medios de cultivo suplementados con el prebiótico HA (Figura 9).

Discusión

Efectos sobre la ecología y fisiología del tracto intestinal

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, la utilización del AF (dieta suplementada con el prebiótico HA) en la alimentación de las aves podría ser una herramienta nutricional importante para encontrar un buen balance entre el desarrollo del tracto intestinal (ecología y fisiología) durante los primeros días de vida y las exigencias de producción a las que el pollo de engorda es sometido. En las primeras horas de vida del pollo, la digestión y absorción de nutrientes, son dos funciones elementales para su sobrevivencia y desarrollo, no solo para la primera semana de edad, sino para todo el ciclo de producción.^{30,51,53,54,55,71} Sin embargo, bajo los esquemas actuales de producción, el pollo de engorda neonato tiene poca oportunidad de madurar fisiológicamente por el periodo de vida tan corto que tiene y el estrés fisiológico al que es sometido. En los primeros días de vida, el pollo tiene que competir por espacio, alimento y jerarquías. Esta competencia resulta en pollos de diferentes tallas (pequeños, medianos y grandes), donde los animales “retrasados” (pequeños) que no consumen la misma cantidad de nutrientes,⁷² forman parte de la mortalidad o son las aves de menor peso corporal al final del ciclo de producción.

En el presente estudio, la administración (durante las primeras tres semanas de vida) de un AF en pollos de engorda, mejoró significativamente la ecología del tracto gastrointestinal (parámetros fisiológicos, microbiológicos y de asimilación de nutrientes), así como el desarrollo corporal de las aves.

Los AF tienen la característica de modular varias funciones del tracto gastrointestinal, principalmente por que estimulan la proliferación de la microflora intestinal benéfica.^{1,2,9,5,15,16,25,26,27,28,29} Las comunidades bacterianas del tracto gastrointestinal son tan poderosas metabólicamente como cualquier otro “órgano” del cuerpo,⁷³ por lo que una microflora bien desarrollada y funcional, ayudará a mantener la integridad y función

del sistema digestivo. La microflora gastrointestinal puede metabolizar proteínas, compuestos que contienen sulfuro, glicoproteínas endógenas y exógenas.^{25,74} Algunos microorganismos se desarrollan gracias a los productos intermedios de la fermentación bacteriana como el lactato, succinato, formato y etanol, transformando todos estos metabolitos intermedios en productos finales como los AGCC.⁷⁵ Otros organismos pueden metabolizar CO₂ a butirato o acetato.^{76,77} Gracias a la administración de AF, no solamente es posible afectar la dinámica de las poblaciones benéficas y patógenas a nivel intestinal, sino además se puede modular la ecología intestinal (poblaciones bacterianas, síntesis de metabolitos, exclusión e patógenos, modificación de nichos ecológicos, etc) y con esto favorecer la fisiología gastrointestinal (modulación de la motilidad y proliferación celular de la mucosa intestinal, absorción de nutrientes, modificación de la actividad inmunológica intestinal, regulación de la función endocrina y algunas funciones sistémicas).^{5,13,14,15}

a). Efecto sobre la fisiología del tracto gastrointestinal

Los carbohidratos fermentables pueden modificar la ecología microbiana, actuando estos como un sustrato para la síntesis de AGCC. En los últimos años, la microbiología le ha dedicado más recursos de investigación al estudio de géneros específicos (bacterias lácticas, en especial bifidobacterias y lactobacilus) que a la microflora intestinal completa y a sus metabolitos.^{2,25,15,78} Los AGCC son metabolizados rápidamente por los enterocitos y son el mayor recurso de energía para las células del intestino delgado y grueso.^{79,80} La oxidación de los AGCC proporcionan del 60 al 70% de la energía requerida por el enterocito y son utilizados preferentemente aún en presencia de glucosa.⁸¹ De los principales AGCC, el butirato es el principal combustible para la célula intestinal aún en presencia de glucosa y glutamina.⁸¹

Los resultados del presente estudio sugieren que la administración del AF genera cambios en las poblaciones de lactobacilus y microflora intestinal aeróbica (ver resultados "b). *Efectos sobre la ecología del tracto intestinal*"), estos cambios en las poblaciones intestinales generan cambios en la producción de AGCC, que a su vez modifican el pH del lumen intestinal (Tablas 6 y 7). Al día 10 de edad hay una aparente disminución en el pH del ciego del grupo AF al compararlo con el grupo control (Tabla 7). Sin embargo, este efecto se invierte al día 20 de edad, en donde la administración del AF aumenta ($p < 0.05$) el valor del pH en el lumen del ciego (Tabla 7), y se observa una aparente disminución en la concentración de AGCC en este órgano (Tabla 6). Al día 30 de edad este fenómeno es similar, pero con menores diferencias entre los dos grupos (Tablas 6 y 7). La baja concentración de AGCC en el lumen cecal y valores de pH más elevados, observados en el grupo AF, se relacionan con los hallazgos reportados por otros autores,^{82,83,84,85,86} donde se reporta que la absorción de AGCC es dependiente de la concentración. Ruppin *et al.*, reportó que el proceso de transporte y absorción de los AGCC, va acompañado por un aumento en la absorción de Na, K y agua, además de la alcalinización del lumen intestinal por la acumulación de bicarbonato y PCO_2 .⁸⁶

En el presente estudio, también se observó un aumento en el TTG al día 15 y 26 de edad ($p < 0.05$), inducido por la administración del AF (Tabla 1). Algunos reportes indican que los AGCC producidos en el lumen del intestino grueso, entran a la circulación portal y pueden estimular a la musculatura del tracto intestinal superior.⁸⁷ Estudios manométricos en humanos han demostrado que después de la ingestión de carbohidratos fermentables o la infusión rectal de lactosa o AGCC, se presente una disminución en el tono gástrico, permitiendo un mayor volumen de expansión.⁸⁸ Además, los AGCC tienen la capacidad de modificar la actividad de la válvula ileocecal

por un mecanismo dependiente de la concentración de estos.⁷⁴ El aumento en la actividad de la microflora intestinal (número de microorganismos y metabolismo) podía ser el mecanismo relacionado con el aumento del TTG observado en el presente trabajo.

En las aves alimentadas con el AF el tiempo de retención del alimento en el tracto intestinal fue mayor, es decir, el alimento permanece por más tiempo en el lumen del tracto gastrointestinal. Fenómeno que permite mejor digestión física y química (por enzimas endógenas y enzimas bacterianas) y absorción de nutrientes a través de la mucosa intestinal.

La pared intestinal es la única barrera física entre un medio contaminado con millones de microorganismos patógenos y el "interior" del organismo sano. Hay una serie de compuestos químicos y biomoléculas de diversos orígenes, que interactúan continuamente para mantener el delicado equilibrio entre lo interno y externo, además de permitir la absorción de nutrientes evitando el paso a microorganismos patógenos al sistema circulatorio.⁸⁹

En el presente estudio, la administración del AF en pollos de engorda neonatos, favoreció el desarrollo de la mucosa intestinal. En las aves alimentadas con la dieta suplementada con el prebiótico HA (grupo AF) al día 20 de edad, se observaron vellosidades de ileon 95.7% más largas que la vellosidad del ileon del grupo control (Tabla 3 y Figura 5). Este efecto se podría atribuir al aumento de la actividad de la microflora intestinal y a la síntesis de AGCC. Se ha reportado en mamíferos (roedores) que los AGCC tienen la capacidad de estimular el desarrollo de la mucosa de ileon y colon.^{74,90,91} Otros estudios han demostrado que la suplementación de AGCC retarda la atrofia de la mucosa intestinal en animales alimentados exclusivamente por vía parenteral.⁹² Reimer y McBurney,⁹³ reportaron que la alimentación de roedores con carbohidratos altamente fermentables, promueve el crecimiento de las células de ileon y

aumentan los niveles de péptido-1 mRNA, reponsable de la replicación celular.⁹³ Además de promover el desarrollo de la mucosa intestinal, los AGCC principalmente el butírico, reduce el riesgo de transformaciones aberrantes de las células del intestino grueso. Bajo condiciones normales en roedores, el ácido butírico a una concentración de 10 y 25 mM, favorece la proliferación celular en las criptas de las vellosidades.⁹⁴ En experimentos previos con pollos, patos y gansos se ha demostrado que la dieta (suplementada con fibra fermentable) y el incremento en la actividad de la microflora intestinal (síntesis de AGCC) influyen directamente en el desarrollo e integridad de la mucosa del tracto intestinal.^{60,95,96,97,98,99,100} En estudios en humanos, se ha reportado que la infusión rectal de AGCC genera un aumento de 1.5 a 5 veces más flujo sanguíneo hacia el bazo.¹⁰¹ También se ha reportado un mayor flujo sanguíneo en colon, por la infusión de acetato, propionato o butirato (por separados o combinados).¹⁰² En la actualidad no se conoce el mecanismo exacto a través del cual los AGCC afectan el flujo sanguíneo, pero se sabe que nos es a través de un sistema de prostaglandinas o α - o β - adrenoreceptores.¹⁰³ El mecanismo de acción podría estar relacionado con efectos en las redes nerviosas locales, así como receptores que se afectan directamente en la musculatura intestinal.¹⁰⁴ Gracias a este aumento en el flujo sanguíneo, la oxigenación, transporte y absorción de nutrientes se ve beneficiada. En el presente estudio, la administración del AF suplementado con HA, además de estimular un aumento ($p \neq 0.05$) en el TTG y un mejor desarrollo ($p \neq 0.05$) de la mucosa intestinal (vellosidades más largas), contribuyó a una mejor utilización de la proteína y energía, principalmente al día 10 de edad en el grupo AF, al comparar estos parámetros con el grupo control (Figura 4). Estos hallazgos se relacionan también con el aumento ($p < 0.05$) en la deposición de minerales (cenizas, calcio y fósforo) en tibia al día 10 de edad en el grupo AF (Tabla 4). Sin embargo, este efecto de mayor cantidad de

minerales en tibia al día 10 de edad, es revertido al día 30 de edad, observándose mayor concentración de cenizas, calcio y fósforo en el grupo control (dieta basal; Tabla 4).

Para en el pollo de engorda es una prioridad el rápido desarrollo de las estructuras óseas entre los días 4 y 8 de edad, es aquí donde se presenta la mayor fase de formación de hueso, ya que el pollo está generando una adecuada estructura ósea de soporte para el periodo de desarrollo muscular. En pollos jóvenes hay una rápida mineralización de huesos entre los días 4 al 11 de edad para soportar el peso que a partir de esta fecha, el pollo está ganando. La concentración de cenizas en huesos de después de las tres semanas de edad, es un parámetro muy fluctuante, debido a que a esta edad, ocurren numerosos cambios fisiológicos, principalmente por la generación de masa muscular.¹⁰⁵ Se ha reportado un incremento en la porosidad ósea en pollos seleccionados para rápido crecimiento corporal (pollo de engorda) a las 5 semanas de edad, este fenómeno se ha relacionado con una baja concentración de minerales en hueso, y esto se podría atribuir a un inadecuado aporte de minerales (principalmente calcio y fósforo) en las formulaciones comerciales utilizadas en la actualidad¹⁰⁶ y a la demanda de los tejidos corporales de estas aves de rápido crecimiento. Además, conforme el ave de engorda va ganando peso corporal, sus huesos son relativamente más cortos que los de las aves ligeras. Esta es una ventaja indirecta resultado del proceso de selección, posiblemente generado por la incapacidad de formar huesos largos al mismo tiempo que se está desarrollando músculo.¹⁰⁵ Por lo que las fluctuaciones en las concentraciones de calcio y fósforo en hueso se deben a la movilización de minerales durante la fase de más rápido desarrollo corporal (3 semanas de edad). Se debe recordar que los minerales depositados en hueso, a cualquier edad no son "sustancias puras o fijas", sino que numerosas sustituciones y cambios

ocurren durante el desarrollo corporal, debido a que el hueso es un depósito activo de minerales.¹⁰⁵

La administración del AF no generó cambios ($p > 0.05$) en la ganancia de peso corporal entre el grupo control y el grupo AF durante todo el desarrollo de la prueba (Tabla 2). Sin embargo, la administración del AF mejoró la uniformidad de la parvada a los días 9 y 16 de edad, con diferencias significativas ($p < 0.05$) al día 27 de edad (Tabla 2 y Figuras 1, 2, 3).

El tracto gastrointestinal tiene la función más importante durante los primeros días de vida del pollo, ya que es el órgano proveedor de todos los nutrientes para el desarrollo de todo el individuo. Particularmente en los pollos de engorda, existe el concepto universal de que “un buen inicio significa un bien final”, y bajo este esquema, la uniformidad del peso corporal es un excelente indicador de la salud y el manejo de la parvada. Además, en las plantas de procesamiento automatizadas, la uniformidad juega un papel primordial en la línea de producción. Sin embargo, la selección genética y algunas prácticas de manejo influyen negativamente en la uniformidad, nos de los ejemplos más comunes, es la combinación de huevos fértiles de lotes de reproductoras (diferentes edades) en la planta incubadora.

Debido al crecimiento tan rápido en el pollo de engorda y a la gran cantidad de factores que afectan el desarrollo del ave durante los primeros días de edad, al presentarse un mal comienzo en el desarrollo corporal, no hay tiempo suficiente para compensar un mal inicio de la parvada. Una buena salud del tracto gastrointestinal significa una alta eficiencia, por lo que el uso de alimentos funcionales (suplementados con probióticos, prebióticos o simbióticos) es una buena herramienta nutricional para modular la ecología intestinal y con esto promover el desarrollo del tracto gastrointestinal, un buen desempeño y un estado de salud.

b). Efecto sobre la ecología del tracto intestinal

Inmediatamente después del nacimiento el pollo recién nacido tienen que modificar su metabolismo intestinal para poder absorber los nutrientes que necesita para su desarrollo a partir de una fuente exógena rica en carbohidratos y proteína (dieta). Durante estos días, en el tracto gastrointestinal sufre dramáticos cambios en tamaño y morfología.^{107,108} Con la primera ingesta de alimento se inicia la activación de la secreción de enzimas a nivel gastrointestinal, la liberación de hormonas y la activación de la motilidad y absorción intestinal.¹⁰⁹ El pH ácido a nivel gástrico, y la secreción de ácido clorhídrico por parte de la mucosa, son una importante defensa en contra de microorganismos patógenos durante los primeros días de vida en el animal recién nacido.¹¹⁰ Las células globulares que cubren superficie de la mucosa epitelial con sus secreciones de moco, son una importante línea de defensa que interfieren con la adhesión de los antígenos a la mucosa. Además, se ha documentado la importancia de un temprano establecimiento de una microflora intestinal madura, y que gracias a la administración de probióticos, se puede acelerar este proceso y excluir el desarrollo de poblaciones patógenas en el tracto gastrointestinal.^{23,111,112} Otro mecanismo de defensa inespecífico asociado al tracto intestinal es el grado de maduración de las células de la mucosa intestinal, las cuales desarrollan una mejor respuesta en contra de los antígenos cuando alcanzan cierto grado de grado de madurez fisiológica.¹¹³ En el presente estudio, se observó una reducción ($p < 0.05$) en el número total de órganos internos (bazo e hígado) positivos a SE al día 10 y 20 de edad en el grupo al que se le suministró el AF (Tabla 8). Este aumento en la exclusión de SE, no se relaciona con una alta concentración de AGCC en el lumen intestinal o a una reducción el pH del contenido cecal al día 10 y 20 de edad. Como ya se mencionó anteriormente, la

concentración de AGCC y la subsiguiente disminución del pH, es una condición temporal que se ve afectada por la absorción (dependiente de la concentración) de estos metabolitos.⁸⁶ La existencia de una relación entre la concentración de AGCC, la reducción de pH y el grado de exclusión de salmonela no es soportada por el presente estudio. Estos resultados concuerdan con los hallazgos reportados por Chambers et al. (1997),¹¹⁴ quien no observó una relación adecuada entre el porcentaje de exclusión de salmonela y la reducción del pH en el lumen intestinal de pollos de engorda alimentados con una dieta adicionada con oligosacáridos. Esta información indica que una alta concentración de AGCC (principalmente el ácido propiónico) en el lumen intestinal no es el único factor responsable en la reducción de la colonización por salmonela, sino que además existen otros factores involucrados en la presentación de este fenómeno de exclusión, como la competencia directa por nutrientes limitantes,^{115,116} competencia por receptores celulares inespecíficos,¹¹⁷ la síntesis de bacteriocinas,^{118,119,120} y probablemente por algunos componentes presentes en los prebióticos que promuevan la actividad antimicrobial.¹²¹ La capacidad de los patógenos intestinales para establecerse en el lumen intestinal y atravesar la mucosa del intestino, es afectada por el microambiente local y la presencia de la microflora intestinal endémica. Además, el rápido establecimiento de una microflora intestinal madura, es un factor elemental en la prevención de la colonización por salmonela. Se han reportado numerosas investigaciones donde se documenta el efecto protector de la microflora intestinal contra salmonela, sin cambios aparentes en las concentraciones de ácido propiónico^{112,122,123} y en los valores de pH del contenido intestinal.¹²³ La marcada reducción en la invasión a órganos internos en las aves del grupo AF (dieta suplementada con HA) en el presente trabajo, podría ser asociada con un aumento en las poblaciones bacterianas aeróbicas intestinales, aumento en el número de microflora intestinal benéfica (lactobacillus), una mayor integridad de la mucosa intestinal, así como la producción de bacteriocinas,

factores que influyen directamente en la exclusión de salmonela y que son estimulados por la inclusión del prebiótico HA como se observó en el presente estudio (Tablas 3, 8 y Figuras 5, 6, 7, 8, 9).

Audisio et al., (2001),¹¹⁸ reportó que la síntesis de bacteriocinas por parte de la microflora intestinal, depende directamente del sustrato (recursos de carbohidratos complejos) en el que el microorganismo se está desarrollando. De acuerdo con este concepto, y con los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* con lactobacinas, se sugiere que el prebiótico HA podría ser un adecuado sustrato bacteriano para la síntesis de bacteriocinas en la ecología intestinal (Tabla 9).

Existen numerosos reportes en pollos de engorda, donde se demuestra una marcada reducción en la colonización de salmonela por la suplementación de un sustrato bacteriano a base de carbohidratos complejos,^{27,114,124,125,126,127} y levaduras,¹²⁸ los cuales modifican la ecología del tracto intestinal.

Las bacteriocinas han sido descritas como un grupo heterogéneo de componentes con actividad antibacterial, que son sintetizadas por una gran variedad de microorganismos de ecosistemas complejos. Su espectro de modo de acción, espectro, peso molecular, propiedades bioquímicas y origen genético varía entre cada microorganismo que la produce.^{129,130,131} Se sabe que bacterias, hongos y levaduras tienen la capacidad de sintetizar estas sustancias antimicrobianas.¹³² Datos experimentales con cultivos de *E. coli* y levaduras, sugieren que aproximadamente el 35% de las cepas de estos microorganismos son bacteriogénicos.¹³² Además diferentes autores han postulado que la capacidad de producción de bacteriocinas juega un papel muy importante en la colonización y procesos de protección que se llevan a cabo en ecosistemas complejos.¹³³ En el presente trabajo, la administración del AF en pollos de engorda aún bajo condiciones de estrés (dieta formulada con 40% trigo e infectados con coccidias) favoreció el desarrollo de la microflora intestinal aeróbica, sin generar un desbalance en

el número de microorganismos patógenos (*Clostridium* sp). Estas condiciones de estrés (dieta estresante e infección con coccidia) han sido asociadas con problemas entéricos (enteritis necrótica) por la pérdida del equilibrio en la ecología intestinal (cambios de pH en el lumen intestinal, proliferación de flora patógena y daño a la mucosa intestinal).¹³⁴ Es probable que el balance entre la microflora y ecosistema intestinal observado en el presente estudio, sea regulado por la síntesis de bacteriocinas que la gran mayoría de los miembros del ecosistema intestinal producen. Este efecto benéfico de mantener la ecología intestinal saludable por la administración del AF se puede ver reflejado en la mayor ($p < 0.05$) ganancia de peso corporal al día 26 de edad.

En los ecosistemas digestivos de mamíferos y aves, se ha podido evidenciar la presencia de estos microorganismos con actividad bacteriocida,^{64,65,118,119,135} lo que sugiere que la síntesis de bacteriocinas es un mecanismo fundamental en el proceso de colonización, resistencia y función de la microflora intestinal microflora.⁶⁵ Varios estudios en aves, han reportado que la microflora ácido láctica aislada del tracto intestinal tienen la capacidad de conferir protección en contra de salmonela gracias a la producción de bacteriocinas.^{118,119,136} Por lo que la síntesis de bacteriocinas a nivel intestinal podría ser uno de los mecanismos involucrados en la reducción de colonización a órganos internos por salmonella, observada en el presente trabajo.

La síntesis de bacteriocinas por parte de la microflora intestinal tiene un costo metabólico muy alto, debido al desgaste energético para la síntesis de este metabolito y generación de una protección (inmunidad) para que la bacteria no sea afectada por esta su propia bacteriocina.¹³⁷ Este costo energético se ve reflejado en la baja capacidad para competir por sustratos, por lo que las bacterias bacteriogenicas, están en desventaja en la obtención de sustratos.¹³⁷ Por esta razón, la microflora intestinal benéfica debe ser "alimentada con un sustrato específico", que le permita cubrir sus necesidades metabólicas y participar activamente en la ecología intestinal.

En base a los resultados observados en el presente trabajo, se propone que la suplementación de prebióticos en las dietas comerciales para pollo de engorda, debería ser considerada como un "ingrediente esencial" de la formulación (alimentos funcionales), ya que proporcionan un sustrato adecuado para el desarrollo y metabolismo de la microflora intestinal y la activación de la fisiología intestinal en el pollo neonato.

Conclusión

Estos experimentos fueron diseñados para estudiar el efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus*, sobre la fisiología y ecología del tracto gastrointestinal de pollos de engorda neonatos. La figura 10, describe los posibles mecanismos fisiológicos a través de los cuales, la suplementación del prebiótico en la dieta funcional genera modificaciones en la ecología intestinal, favoreciendo con esto el funcionamiento saludable de los intestinos, como es la proliferación de una microflora intestinal benéfica, la síntesis de AGCC, la síntesis de bacteriocinas, la disminución en el TTG, el mejor desarrollo de la mucosa intestinal, la mejor utilización de proteína y energía proveniente de la dieta, la más rápida mineralización de huesos en los primeros días de edad y la uniformidad de la parvada al final del ciclo de producción. Los resultados del presente estudio sugieren que el uso de alimentos funcionales (suplementados con prebióticos, probióticos y simbióticos) podría sustituir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en las dietas para pollos de engorda.

En base a los resultados observados en el presente trabajo, se propone que la suplementación de prebióticos en las dietas comerciales para pollo de engorda, debería ser considerada como un "ingrediente esencial" de la formulación (alimentos funcionales), ya que proporcionan un sustrato adecuado para el desarrollo y metabolismo de la microflora intestinal y la activación de la fisiología intestinal en el pollo neonato.

Conclusión

Estos experimentos fueron diseñados para estudiar el efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus*, sobre la fisiología y ecología del tracto gastrointestinal de pollos de engorda neonatos. La figura 10, describe los posibles mecanismos fisiológicos a través de los cuales, la suplementación del prebiótico en la dieta funcional genera modificaciones en la ecología intestinal, favoreciendo con esto el funcionamiento saludable de los intestinos, como es la proliferación de una microflora intestinal benéfica, la síntesis de AGCC, la síntesis de bacteriocinas, la disminución en el TTG, el mejor desarrollo de la mucosa intestinal, la mejor utilización de proteína y energía proveniente de la dieta, la más rápida mineralización de huesos en los primeros días de edad y la uniformidad de la parvada al final del ciclo de producción. Los resultados del presente estudio sugieren que el uso de alimentos funcionales (suplementados con prebióticos, probióticos y simbióticos) podría sustituir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en las dietas para pollos de engorda.

Referencias

1. Bruce G, Schiffrin EJ, Reniero R, Mollet B, Pfeifer A, Neeser J. The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends Biotechnol.* 1999;17(12):492-499.
2. Roberfroid MB. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr.* 1999;129:1398s-1401s.
3. Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(suppl):1660s-1664s.
4. Gerdes S. Functional dairy products. Ed. John Libbey. 2000, France.
5. Roberfroid MB. Prebióticos and probióticos: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(suppl):1682s-1687s.
6. Bellisle F, Diplock AT, Hornstra G. Functional food science in Europe. *Br J Nutr* 1998;80(suppl):s3-4.
7. Clydesdale F. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr Rev.* 1997;55:413-422.
8. Macfarlane GT, Cummings JH. probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *BMJ.* 1999;318:999-1003.
9. Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J Nutr Biochem.* 1998;9(12):668-675.
10. DeFelice SL. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Sci Tech.* 1995;6:59-61.
11. Hardy G. Nutraceutical and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition.* 2000;16:688-697.
12. Van Loo J, Cummings J, Delzeme N, Englyst H, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M, vanVliet T, van den Heuvel E. Functional Food

properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). Br J Nutr.1999;81(2):121-132.

13. Duffy LC, Zielezny,MA, Riepenhoff-Talty M, Dryja D, Sayahthaheri-Altaie S, Griffiths E, Ruffin D, Barrett H, Rossman J, Ogra PL. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr Res.* 1994;35:690–695.
14. Yolken RH, Ojeh C, Khatri IA, Sajjan U, Forstner JF. Intestinal mucins inhibit rotavirus replication in an oligosaccharide-dependent manner. *Jour Inf Dis.* 1994;169(5):1002–1006.
15. Roberfroid MB. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev.* 1996;54:s38-s42.
16. Berg RD. Probiotics, prebiotics or conbiotics. *Trends Microbiol.* 1998;89(6):89-92.
17. McIntosh GH. Probiotics and colon cancer prevention. *Asia Pacific J Clin Nutr.*1996;5:48-52.
18. Tamine AY. Fermented milks: historical food with modern applications. *Memorias: Symposium Danone, Fermented food, fermentation and intestinal flora, México (D.F.); May 17-18, 2001.*
19. Tannock GW. *Probiotics: a critical review.* Ed. Horizon Scientific Press, 1999. England.
20. Perdigon G, Medina M, Rachid M, Medici M, Maldonado C, Moreno A. Mechanism of interaction of lactic acid bacteria with the gut and immune system. Antitumour activity of yogurt. *Memorias: Symposium Danone, Fermented food, fermentation and intestinal flora, México (D.F.); May 17-18, 2001.*
21. Guamer F. *Role of microbiology in chronic inflammatory bowel diseases.* *Memorias: Symposium Danone, Fermented food, fermentation and intestinal flora, México (D.F.); May 17-18, 2001.*

22. Fuller R. Probiotics 2: Applications and practical aspects. Ed. Chapman & Hall. 1997, Great Britain.
23. Tellez G, Petrone VM, Escorcia M, Morishita TY, Cobb CW, Villasenor L. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* Enteritidis-, *Salmonella* Typhimurium-, and *Salmonella* Heidelberg-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* Enteritidis in broilers. *J Food Prot.* 2001;64(3):287-91.
24. Nava MG. Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial (preempttm) sobre la mortalidad y transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollo de engorda. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. (2000).
25. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:104-112.
26. Collins MD, Gibson GR. probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(suppl):1052s-1057s.
27. Tellez G, Dean CE, Corrier DE, Deloach JR, Jaeger L, Hargis BM. Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids, and *Salmonella* enteritidis organ invasion in Leghorn chicks. *Poult Sci.* 1993;72(4):636-42.
28. Audisio M, Oliver G, Apella MC. Effect of different complex carbon source on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2001;63:235-241.
29. Berg RD. Bacterial Translocation from intestines. *Exp Anim.* 1985;34:1-16.
30. Croom WJ, Brake J, Coles BA, Havenstein GB, McBride BW, Peebles DE, Taylor IL. Is intestinal absorption capacity rate-limiting for performance in poultry. *J Appl Poultry Res* 1999;8:242-252.

31. Dror Y, Nir I, Nitsan Z. The relative growth of internal organs in light and heavy breeds. *Br Poultry Sci* 1977;18:493-496.
32. Cherry JA, Nir I, Jones DE, Dunnington EA, Nitsan Z, Siegel PB. Growth associated traits in parental and F1 populations of chickens under different feeding programs. 2. *ad libitum* feeding. *Poultry Sci* 1987;66:1-9.
33. Krogdahl A, Sell JL. Influence of age on lipase, amylase, and protease activities in pancreatic tissue and intestinal contents of young turkeys. *Poultry Sci* 1989;68:1561-1568.
34. Golian A, Maurice DV. Dietary poultry fat and gastrointestinal transit time of feed and fat utilization in broiler chickens. *Poult Sci* 1992;71:1357-1363.
35. Dänicke S, Simon o, Jeroch H, Keller K, Gläser K, Kluge H, Bedford MR. Effects of dietary fat type, pentosan level and xylanase supplementation on digestibility of nutrients and metabolizability of energy in male broilers. *Arch Anim Nutr* 1999;52:245-261.
36. Lee A. Neglected niches, the microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Adv Microb Ecol* 1985;8:115-120.
37. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev.Microbiol* 1977;31:107-113.
38. Freter R, Brickner H, Botney M, Clean D, Aranki A.. Mechanism that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun* 1983;39:676-683.
39. Savage DC. Mechanisms by which indigenous microorganism colonize gastrointestinal epithelial surfaces. *Prog Food Nutr Sci* 1983;7:65-70.
40. Farmer DS. Gastric hydrogen ion concentration and acidity in the domestic fowl. *Poult Sci* 1943;22:79.

41. Bi Yu, Hau-Yang T, Wen-Shyg C. Caecal culture enhances performance and prevents *Salmonella* infection in broilers. J Appl Poultry Res 1999;8:195-204.
42. Nava MG, Juárez EM, Téllez IG. Efecto de una dieta adicionada con un oligosacárido sintético comercial sobre los cambios morfológicos, de pH en el ciego e invasión a órganos por *E. coli* y *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda de un día de edad. Memorias de XXIV convención anual ANECA, 1999 mayo 5-8; León (Gto.) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas A. C., 1999:200-203.
43. Tellez IG. Endogenous factors and mechanisms that confer resistance to *Salmonella enteritidis* infectivity in the intestinal tract of Leghorn chickens. (Tesis de Doctorado), Texas, U.S. A. college of Veterinary Medicine, Texas A & M University, 1992.
44. Kogut M, Fukata T, Tellez GI, Hargis M. Effect of *Eimeria tenella* infection on resistance to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with anaerobic cecal flora and feed dietary lactose. Avian Dis 1994;38:59-64.
45. Tellez GI, Jaeger L, Dean CE, Corrier E, Williams JD, DeLoach R, Hargis BM. Prolonged administration of dietary capsaicin reduces *Salmonella enteritidis* in Leghorn chicks. Avian Dis 1993;37:143-148.
46. Deschner EE, Cohen BI, Raicht RF. Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. Digestion 1982;21:290-296.
47. Lupton JR, Jacobs LR. Fiber supplementation results in expanded proliferative zones in rat gastric mucosa. Am J Clin Nutr 1987;46:980-984.
48. Sigalet DL, Lees GM, Aherne F, Van Aerde JE, Fedorak RN, Keelan M, Thomson AB. The physiology adaptation to small bowel resection in the pig: an integrated study of morphological and functional changes. J Pediatr Surg 1990;25(6):650-657.

49. Grobas S, Mateos GG, Mendez J. Influence of dietary linoleic acid on production and weight of eggs components in young brown hens. *J Appl Poultry Res* 1999;8:177-184.
50. Buyse J, Michels H, Vloeberghs J, Saevels P, Aerts JM, Ducro B, Berckmans D, Decuypere E. Energy and protein metabolism between 3 and 6 weeks of age of male broiler chickens selected for growth rate or for improve food efficiency. *Br Poultry Sci.* 1998;39:264-272.
51. Lippens M, Room G, De Groote G, Decuypere E. early and temporary quantitative food restriction of broiler chickens. 1. Effects on performance characteristics, mortality and meat quality. *Br Poultry Sci.* 2000;41:343-354.
52. Whitehead CC. Nutrition: the integrative science. *Br Poultry Sci.* 2000;42:5-15.
53. Uni Z, Noy Y, Sklan D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestine in heavy and light-strain chicks. *Poultry Sci.* 1995;74:1622-1629.
54. Sklan D, Noy Y. Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. *Poultry Sci.* 2000;79:1306-1310.
55. Havelly O, geyra A, barak M, Uni Z, Sklan D. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *J Nutr.* 2000;130:858-864.
56. Hooge DM., Cummings KR., McNaughton JL. Evaluation of sodium bicarbonate, chloride, or sulfate with a coccidiostat in corn-soy or corn-soy-meat diets for broilers chickens. *Poultry Science* 78:1300-1306.
57. Hill FW, Anderson DL. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J. Nutrition* 1958;64:687-603.
58. Corrier DE, Hinton A, Ziprin RL, DeLoach JR. Effect of dietary lactose on *Salmonella* colonization of market-age broiler chickens. *Avian Dis* 1990;34:668-676.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

59. Rolfe RD. Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*. Infect Immun 1984;45(1):185-191.
60. Yasar S., Forbes JM. Performance and gastrointestinal response of broiler chickens fed on cerealgrain-based foods soaked in water. Br Poultry Sci 1999;40:65-76.
61. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1990.
62. Callaway TR, Anderson RC, Anderson TJ, Poole TL, Bischoff KM, Kubena LF, Nisbet DJ. *Escherichia coli* O157:H7 becomes resistant to sodium chlorate in pure culture, but not in mixed culture or *in vivo*. J Appl Microbiol. 2001;91:427-434.
63. Koransky JR, Allen SD, Dowell VR. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. Appl Environ Microbiol 1978;35:762-765.
64. Gomez S., Cosson C., Deschamps AM. Evidence for a bacteriocins-like substance produced by a new strain of Streptococcus sp, inhibitory to gram food-borne pathogens. Res Microbiol 1997;148:757-766.
65. Dabard J, Bridonneau, Phillipe C, Anglade P, Molle D, Nardi M, Ladire M, Girardin H, Marcille F, Gomez A, Fons M. Ruminococci A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4111-4118.
66. Andrews HW, Poelma PL, Wilson CR, Romero A. isolation and identification on Salmonella in: Bacteriological analytical manual, 5th Ed. Associations of Official Analytic Chemistry, Washington, DC.pag 1-29 .1978.
67. National Research Council. Nutrients Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC. 1994.
68. Luginbuke RC, Schlotzhauer SD. Pages 55-573 in: SAS/STAT® Guide for Personal Computers. 6th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC. 1987.

69. SAS Institute. SAS/STAT® Guide for the Personal Computers. Version 6.02. SAS Institute Inc., Cary, NC. 1987.
70. Zar J. Biostatistical analysis. 2^a ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall Inc. 1984.
71. Geyra A, Uni Z, Sklan D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *Br J Nutr.* 2001;86(1):53-61.
72. Rovee-Collier C, Hayne H, Collier GH. The timing of food availability affects growth in chicks. *Dev Psychobiol.* 1998;32:183-197.
73. Nuotio L, Mead GC. An in vitro model for studies on bacterial interactions in the avian caecum. *Lett Appl Microbiol.* 1993;17:65-67.
74. Topping DI, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81:1031-1064.
75. Macfarlane GT, Gibson GR. Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. Pag 87-98 *in: Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids.* Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.1995.
76. Miller TL, Wolin MJ. Methanogens in animal and human intestinal tract. *Syst Appl Microbiol.*1996;7:223-229.
77. Durand M, Bernalier A. Reductive acetogenesis in animal and human gut. Pages 107-132 *in: Physiological and Clinical Aspects of Short-chain Fatty Acids* Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. 1995.
78. Bird AR, Brown LL, Topping DI. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*2000;1:25-37.
79. Yang MG, Manoharan K, Mickelsen O. Nutritional contribution of volatile fatty acids from the cecum of rats. *J Nutr.*1970;100:545-550.
80. Windmueller HG, Spaeth AE. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabruptive rat small intestine. *J Biol Chem* 1978;253:69-79.

81. Roediger W. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*.1980;21:793-798.
82. Ash RW, Dobson A. The effect of absorption on the acidity of the rumen contents. *J Physiol*.1963;169:36-61.
83. Henning SJ, Hird FJ. Transport of acetate and butyrate in the hind/gut of rabbits. *Biochem J*.1972;130:791-796.
84. Schmit MG, Soergel KH, Wood CM. Absorption of short chain fatty acids from the human jejunum. *Gastroenterology*.1976;70:211-215.
85. Schmit MG, Soergel KH, Wood CM. Absorption of short chain fatty acids from the human ileum. *Am J Dig Dis*.1977;22:340-347.
86. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*.1980;78:1500-1507.
87. Husebye E, Hellestrom PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ- free rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol*.2001;280:G368-G380.
88. Ropert A, Cherbut C, Roze C, Le Quellec A, Holst Jj, Fu-Cheng X, Bruley S. Des Varannes, Galmiche JP. Colonic fermentation and gastric tone in humans. *Gastroenterology*.1996;111:289-296.
89. Apajalahti J, Bedford MR. Improve bird performance by feeding its microflora. *World Poultry*. 1999;15:20-23.
90. Sakata T, Yajima T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. *Q J Exp Physiol*.1984;69:639-648.
91. Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JI. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short chain fatty acids. *J Parent Enteral Nutr*.1989;13: 109-116.

92. KorudaMJ, Rolandelli RH, Zimmaro-Bliss D, Hastings J, Settle RG. Parenteral nutrition supplemented with SCFA: effect on the small bowel mucosa in normal rats. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:685-689.
93. Reimer RA, Mcburney Mi. Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and postprandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology.* 1996;137:3948-3956.
94. Velazquez OC, Seto RW, Bain AM, Fisher J, Rombeau JI. Deoxycholate inhibits in vivo butyrate-mediated BrDU labeling of the colonic crypt. *J Surg Res.* 1997;69:344-348.
95. Rolls BA, Turvey A, Coates M. The influence of the gut microflora and dietary fibre on epithelial cell migration in the intestine. *Br J Nutr.* 1978;39:91-98.
96. Furuse M, Yang SI, Niwa N, Okumura J. Effect of short chain fatty acids on the performance and the intestinal weight in germ free and conventional chicks. *Br Poultry Sci.* 1991;32:159-165.
97. Yu B, Tsai CC, Hsu JC, Chiou PW. Effect of different sources of dietary fiber on growth performance, intestinal morphology and cecal carbohydrases of domestic geese. *Br Poultry Sci.* 1998;39:560-567.
98. Langhout DJ, Schutte, JB, Van Leeuwen P, Wiebenga J, Tamminga S. Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of small intestine wall of broiler chicks. *Br Poultry Sci.* 1999;40:340-347.
99. Smits CH, Te Maarseen CA, Mouwen JM, Koninkx JF, Beynen AC. The antinutritive effect of carboxymethylcellulose with high viscosity on lipid digestibility in broiler chickens is not associated with mucosal damage. *J Anim Physiol A Anim Nutr.* 2000;83:239-245.
100. Jamroz D, Jakobsen K, Orda J, Skorupinska J, Wiliczekiewicz A. Development of the gastrointestinal tract and digestibility of dietary fibre and amino acids in young

- chickens, ducks and geese fed diets with high amounts of barley. *Comp Bioch Physiol A*.2001;130:643-652.
101. Mortensen FV, Hesso I, Birke H, Korsgaard R, Nielsen H. Microcirculatory and trophic effects of short chain fatty acids in the human rectum after Hartmann's procedure. *Br J Surg*.1991;78:1208-1211.
 102. Kvietys PR, Granger DN. Effect of volatile fatty acids on blood flow and oxygen uptake by the dog colon. *Gastroenterology*.1981;80:962-969.
 103. Mortensen FV, Nielsen H. In vivo and in vitro effects of short chain fatty acids on intestinal blood circulation. Pag. 391-423 *in: Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.1995.
 104. Cherbut C. Effects of short chain fatty acids on gastrointestinal motility. Pag 191-234 *in: Physiological and Clinical Aspects of Short-chain Fatty Acids* Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.1995.
 105. Williams B, Solomon S, Waddington D, Thorp B, Farquharson C. Skeletal development in the meat-type chicken. *Br Poultry Sci*.2000;41:141-149.
 106. Thorp BH, Waddington D. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-d-old broiler chickens. *Res Vet Sci*.1997;62:67-73.
 107. Uni Z, Ganot S, Sklan D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Sci*.1998;77:75-82.
 108. Uni Z, Noy Y, Sklan D. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Poultry Sci*.1999;78:215-222.
 109. Perin NM, Clandinin T, Thomson AB. Importance of milk and diet on the ontogeny and adaptation of the intestine. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:419-25.
 110. Grand RJ, Watkins JB, Torti FM. Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology* 1976;70:790-810.

111. Nisbet DJ, Tellez G, Lowry V, Anderson R, Garcia G, Nava G, Kogut M, Corrier D, Stanker L. Effect of commercial competitive exclusion culture (Preempt) on Mortality and horizontal transmission of *Salmonella gallinarum* in broiler chicks. Avian Dis.1998;42:651-656.
112. Corrier DE, Nisbet JD, Scanlan MC, Tellez G, Hargis BM, DeLoach JR. Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in Leghorn chicks by a defined culture of cecal bacteria and dietary lactosa. J Food Protec.1994;56:337-381.
113. Van der Heijden PJ, Bianchi AT, Dol M, Pals JW, Stok W, Bokhout A. Manipulation of intestinal immune responses against ovalbumin by cholera toxin and its B subunit in mice. Immunology 1991;72(1):89-93.
114. Chambers JR, Spencer JL, Modler HW. The influence of complex carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization, pH, and density of broiler ceca. Poultry Sci. 1997;76:445-451.
115. Ha SA, Ricke SC, Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR. Serine utilization as a potential competition mechanism between *Salmonella typhimurium* and a chicken cecal bacterium. J Food Prot. 1995;57:1074-1079.
116. Nisbet DJ, Corrier DE, Ricke SC, Hume ME, Byrd JA, DeLoach JR. Cecal propionic acid as a biological indicator of early establishment of a microbial ecosystem inhibitory to *Salmonella* in chicks. Anaerobe.1996;2:354-350.
117. Mead GC. Microbial ecology of the digestive tract. Code S3.5.02 in: Proceedings of the XXI World's Poultry Congress. The World's Poultry Science Association, Montreal, Can.2000.
118. Audisio MC, Oliver G, Apella MC. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. Int. J. Food Microbiol. 2001;63:235-241.

119. Jennes W, Dicks LMT, Verwoerd DJ. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J Appl Microbiol.*2000;88:349-357.
120. Mead GC. Prospects for "competitive exclusion" treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Vet J.*2000 159:111-123.
121. Fuglsang CCC, Johansen S, Christgau, Adler-Nissen J. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 1995;61:390-396.
122. Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. *Avian Dis.*1993;37:528-535.
123. Ziprin RL, Corrier DE, DeLoach JR. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with *in vivo*-passaged anaerobes. *Avian Dis.*1993;37:183-188.
124. Allen VM, Fernandez F, Hinton MH. Evaluation of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on salmonella colonisation in poultry. *Br. Poultry Sci.*1997;38:485-488.
125. Orban J I, Patterson JA, Sutton AL, Richards GN. Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestinal bacterial populations of broiler chickens. *Poultry Sci.*1997;76:482-490.
126. Hinton A, Corrier DE, Spates GE, Norman JO, Ziprin RL, Beier RC, DeLoach JR. Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. *Avian Dis.*1990;34:626-633.
127. Oyofe BA, DeLoach JR, Corrier DE, Norman JO, Ziprin RL, Mollenhauser HH. Effects of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis.*1989;33:531-534.

128. Line JE, Bailey JS, Cox NA, Stern NJ, Tompkins T. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Sci.*1998;77:405-410.
129. Tagg JR, Danaji AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.*1976;40:722-256.
130. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother.*1984;26:328-334.
131. Delves-Broughton J. Nisin and its uses as a food preservative. *Food technol.*1990;44:100-113.
132. Tamas LC, Hoekstra RF, Pagie L. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *PNAS.*2002;99:786-790.
133. Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends-Microbiol.*1999;7:129-133.
134. Ficken JK. Necrotic enteritis. In Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald RL, Saif YM, editors. *Diseases of poultry 10th edition*. USA. Iowa State University Press., Pag.264-267.1997.
135. Balla E, Dicks LMT, Du Toit M, Van Der Merwe MJ, Holzappel WH. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071^a and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl Environ Microbiol.*2000;66:1298-1304.
136. Audisio MC, Oliver G, Apella MC. Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp. *J Food Prot.*1999;62:751-755.
137. Lenski RE, Riley MA. Chemical warfare from an ecological perspective. *PNAS.*2002;99:556-558.

TABLA 1. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos de engorda neonatos

Grupo	¶Día 15	¶Día 26
	<i>minutos</i>	
Dieta control	135.20 ± 47.45 ^a	161.9 ± 25.05 ^b
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	168.60 ± 24.77 ^a	193.20 ± 36.25 ^a

¶Días de edad

*Prebiótico harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

El TTG se determinó mediante la diferencia de la presentación del marcador por vía oral y la primera observación del marcador en las excretas. Se utilizó óxido férrico (200 mg/kg PV) en una cápsula de gelatina y se administró por vía oral a diferentes periodos de tiempo. Las aves se colocaron en un corral con cama limpia y después de 2 horas postadministración del marcador, los animales fueron observados continuamente (n=10). Medias ± desviación estándar, filas con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

TABLA 2. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el peso corporal y la uniformidad del peso corporal (coeficiente de variación) en pollos de engorda neonatos

	Dieta control		Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	
	Peso corporal (g)	Uniformidad de peso corporal (CV)	Peso corporal (g)	Uniformidad de peso corporal (CV)
¹ Día 1	46.13 ± 5.87 ^a	ND ¹	46.03 ± 5.21 ^a	ND
Día 9	174.60 ± 16.33 ^a	9.81 ± 0.20 ^a	179.67 ± 13.51 ^a	6.94 ± 3.89 ^a
Día 16	408.21 ± 35.72 ^a	9.61 ± 1.22 ^a	397.40 ± 31.58 ^a	6.11 ± 2.61 ^a
Día 27	1060 ± 110 ^a	9.61 ± 2.08 ^a	1010 ± 70 ^a	7.08 ± 0.07 ^b

¹Días de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto[®]): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

¹ND = Not determinada.

Para determinar la UPC, se calcularon las curvas de la distribución de la población con los pesos corporales obtenidos cada semana de cada ave. Además, se calculó la variabilidad del peso corporal, a través del porcentaje del coeficiente de variación como medida de uniformidad.⁵⁶

Medias ± desviación estándar, valores con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

TABLA 3. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el tamaño de la vellosidad de ileon a los 20 días de edad en pollos de engorda neonatos

Grupo	Ileon	Ciego
Dieta control	392.4 ± 187.38 ^b	233.40 ± 78.8 ^a
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	768.0 ± 201.34 ^a	249.60 ± 61.46 ^a

*Prebiótico harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA. Inmediatamente después del sacrificio, se colectaron muestras de aproximadamente 3 cm de ileon y ciego que fueron fijadas en solución de formalina amortiguada al 10%. Estas muestras fueron procesadas con las técnicas de rutina de histología. Secciones (~5 µm) fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos fueron evaluados en un microscopio óptico. El largo de las vellosidades fue medido con una cuadrícula micrométrica y se evaluó la mucosa en 5 puntos diferentes seleccionados al azar.⁶⁰ (n=5). Medias ± desviación estándar, valores con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

TABLA 4. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la concentración de cenizas, calcio y fósforo en tibias de pollos de engorda neonatos

	Dieta control			Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *		
	Cenizas	Calcio	Fósforo	Cenizas	Calcio	Fósforo
ε Día 10	13.00 ± 0.61 ^a	4.63 ± 0.29 ^b	2.33 ± 0.13 ^b	14.64 ± 1.99 ^a	5.40 ± 0.74 ^a	2.64 ± 0.34 ^a
Día 20	13.70 ± 0.99 ^a	5.14 ± 0.30 ^a	2.46 ± 0.15 ^a	13.24 ± 1.10 ^a	4.62 ± 0.53 ^b	2.38 ± 0.19 ^a
Día 30	17.00 ± 2.02 ^a	6.22 ± 0.76 ^a	3.08 ± 0.36 ^a	14.98 ± 0.55 ^b	5.40 ± 0.22 ^b	2.68 ± 0.13 ^b

ε Días de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

Se colectaron las tibias derechas de las aves sacrificadas y se evaluó el porcentaje de cenizas (Pcen), calcio (Pcal) y fósforo (Pfos). Las muestras fueron secadas a 100 C durante 24 hr y posteriormente pesadas y colocadas en una estufa a 600 C durante toda la noche para la determinación de cenizas. El Pcen, Pcal y Pfos fue determinado siguiendo los procedimientos de AOAC (1990).⁶¹ (n=10) Medias ± desviación estándar, valores con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

TABLA 5. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta del contenido de ingluvies en pollos de engorda neonatos

Grupo	4 ^o Día 10	Día 20	Día 30
Dieta control	709.7 ± 575.5 ^a	584.3 ± 365.1 ^a	856.4 ± 678.7 ^a
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	392.7 ± 297.2 ^a	951.0 ± 374.7 ^a	694.6 ± 574.4 ^a

^aDías de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto[®]): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

Para determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales, se colectó una muestra de 0.4 gramos de contenido intestinal que fueron suspendidos en 3.6 ml de agua destilada estéril. La concentración de AGCC total en el contenido cecal o ingluvies se determinó colectando sobrenadante de la suspensión preparada y analizado con equipo de cromatografía de gases con un detector ionizador de flama y un integrador de perfiles, técnicas descritas por Corrier et.al.⁵⁸ y Rolfe⁵⁹ (n=10). Medias ± desviación estándar, filas con similar literal no son estadísticamente diferentes (P>0.05).

TABLA 6. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta del contenido de ciego en pollos de engorda neonatos

Grupo	4 ^a Día 10	Día 20	Día 30
Dieta control	652.8 ± 322.6 ^a	2152.49 ± 2127.9 ^a	2050.7 ± 1049.4 ^a
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	734.9 ± 463.0 ^a	897.9 ± 428.5 ^a	1697.9 ± 853.8 ^a

^aDías de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto[®]): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

Para determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) totales, se colectó una muestra de 0.4 gramos de contenido intestinal que fueron suspendidos en 3.6 ml de agua destilada estéril. La concentración de AGCC total en el contenido cecal o ingluvies se determinó colectando sobrenadante de la suspensión preparada y analizado con equipo de cromatografía de gases con un detector ionizador de flama y un integrador de perfiles, técnicas descritas por Corrier et al.⁵⁸ y Rolfe⁵⁹ (n=10). Medias ± desviación estándar, filas con similar literal no son estadísticamente diferentes (P>0.05).

TABLA 7. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el pH del contenido de ingluvies y ciego en pollos de engorda neonatos

Grupo	Día 10		Día 20		Día 30	
	Ingluvies	Ciego	Ingluvies	Ciego	Ingluvies	Ciego
Dieta control	4.90 ± 0.32 ^a	6.06 ± 0.46 ^a	4.89 ± 0.24 ^a	5.80 ± 0.30 ^b	4.47 ± 0.19 ^a	6.97 ± 0.20 ^a
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	4.89 ± 0.26 ^a	5.79 ± 0.39 ^a	4.69 ± 0.13 ^a	6.73 ± 0.31 ^a	4.81 ± 0.29 ^a	6.94 ± 0.10 ^a

^aDías de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®); PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

Las evaluaciones del pH de contenido de intestinal, se realizó inmediatamente después de que las aves fueron sacrificadas. La lectura del pH del contenido intestinal se realizó insertando un electrodo de vidrio (Orion Research ionalyzer/501; Orion Research Inc., Boston, Mass) dentro del contenido intestinal (n=10). Medias ± desviación estándar, filas con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

TABLA 8. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el grado de colonización e invasión a órganos internos por *Salmonella enteritidis* pollos de engorda neonatos

Group	Día 10			Día 20			Día 30		
	Hígado-bazo	Tonsilas cecales	Positivo/total (%)	Hígado-bazo	Tonsilas cecales	Positivo/total (%)	Hígado-bazo	Tonsilas cecales	Positivo/total (%)
Dieta control	20/20 (100)	20/20 (100)	16/20 (80)	16/20 (80)	20/20 (80)	20/20 (100)	16/20 (80)	20/20 (100)	20/20 (100)
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	11/20 (55)*	20/20 (100)	8/20 (40)*	8/20 (40)*	20/20 (100)	20/20 (100)	17/20 (85)	20/20 (100)	20/20 (100)

*Días de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

A los días 10 y 20 de edad, 20 pollos de cada tratamiento fueron desafiados vía oral con 10⁸ UFC de *Salmonella enteritidis* (SE) resistente a novobiocina y al ácido Nalidixico. Todos los pollos desafiados fueron sacrificados a las 24 horas pos-desafío para intentar el aislamiento de SE de órganos internos siguiendo la metodología descrita por Téllez et al., 1993.⁴⁵

* P<0.01

TABLA 9. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el peso corporal de pollos de engorda neonatos alimentados con una dieta estresante

Group	Día 5	Día 12	Día 19	Día 26
Dieta control	63.96 ± 8.81 ^a	185.02 ± 21.92 ^a	388.89 ± 39.69 ^a	675.50 ± 71.61 ^b
Alimento funcional suplementado con harina de <i>Aspergillus</i> *	65.48 ± 11.51 ^a	185.91 ± 38.53 ^a	411.16 ± 56.32 ^a	738.69 ± 62.69 ^a

^aDías de edad

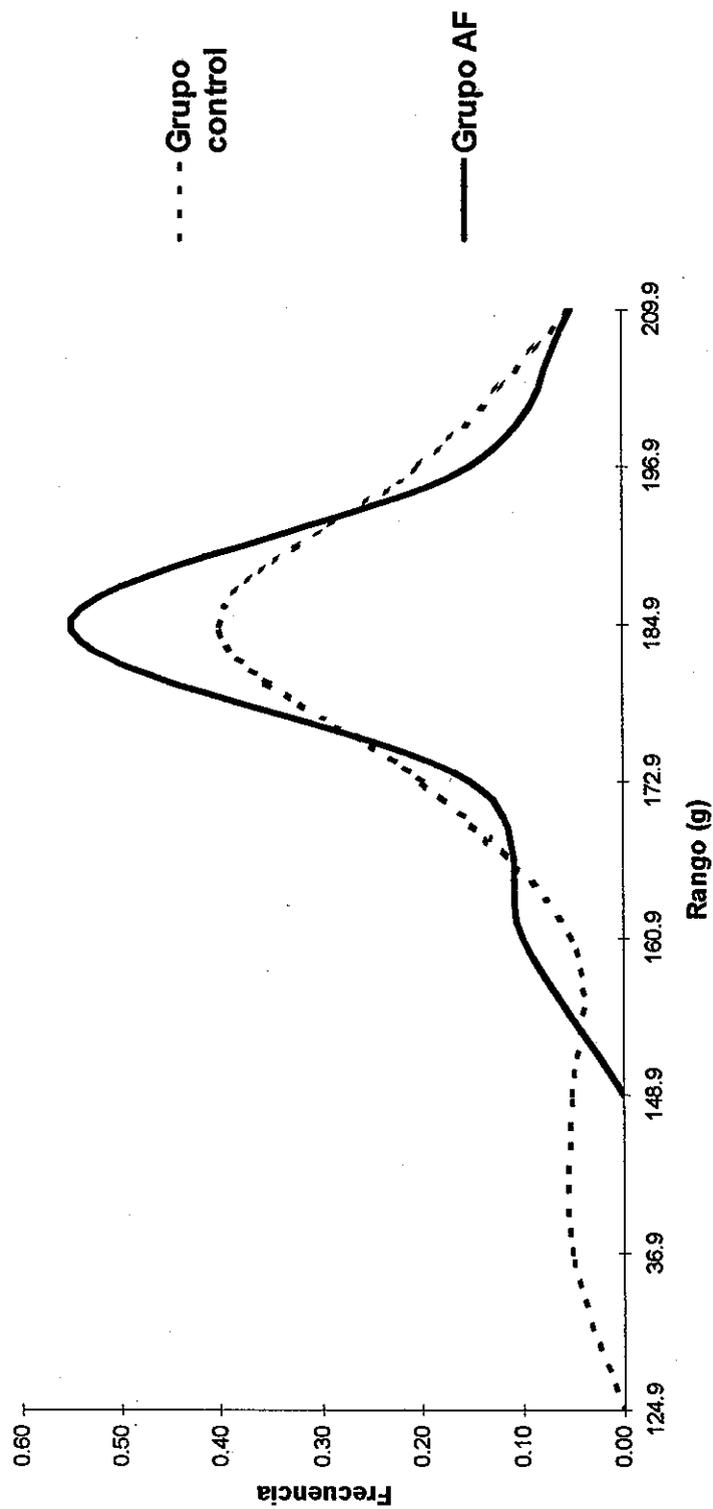
^{**}Pesos corporales en gramos

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto[®]): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

La dieta estresante se administró desde el día uno de edad hasta el final de la prueba, fue una dieta base trigo-soya, formulada alta en trigo (40%). Al día 13 de edad todas las aves fueron desafiadas con *Eimeria acervulina* (5.0x10⁴), *Eimeria maxima* (2.0x10⁵) y *Eimeria tenella* (2.0x10⁴). A los 20 días de edad, se sacrificaron 10 aves por tratamiento para evaluar NMP de microflora intestinal aeróbica y *Clostridium* sp a partir de contenido intestinal de ileon. Todas las aves de cada grupo fueron pesadas a los días 5, 12, 19 y 26 de edad.

Medias ± desviación estandar, valores con diferente literal son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

FIGURA 1. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la uniformidad del peso corporal a los 9 días de edad en pollos de engorda neonatos

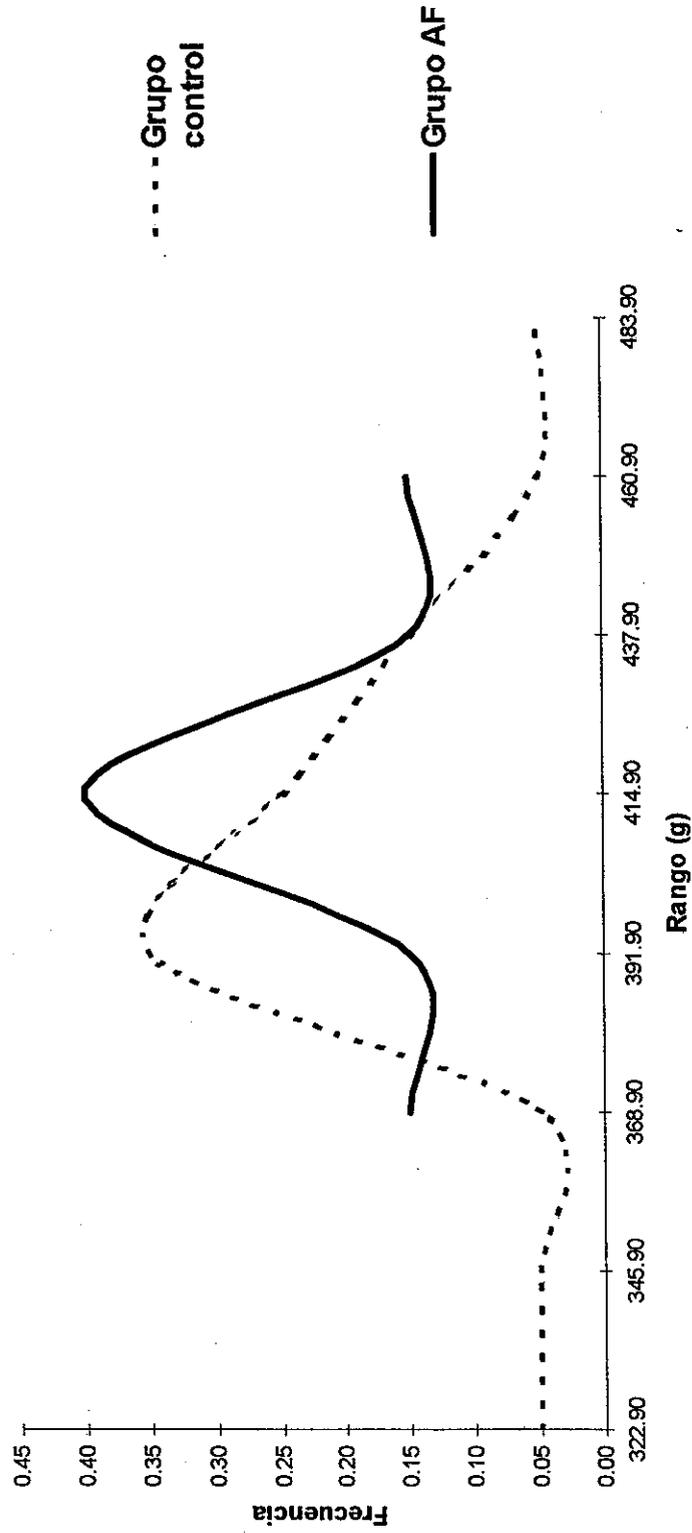


Grupo control (Dieta control), grupo AF (Alimento funcional suplementado con harina de *Aspergillus*)

¶ Rangos en gramos

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

FIGURA 2. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la uniformidad del peso corporal a los 16 días de edad en pollos de engorda neonatos



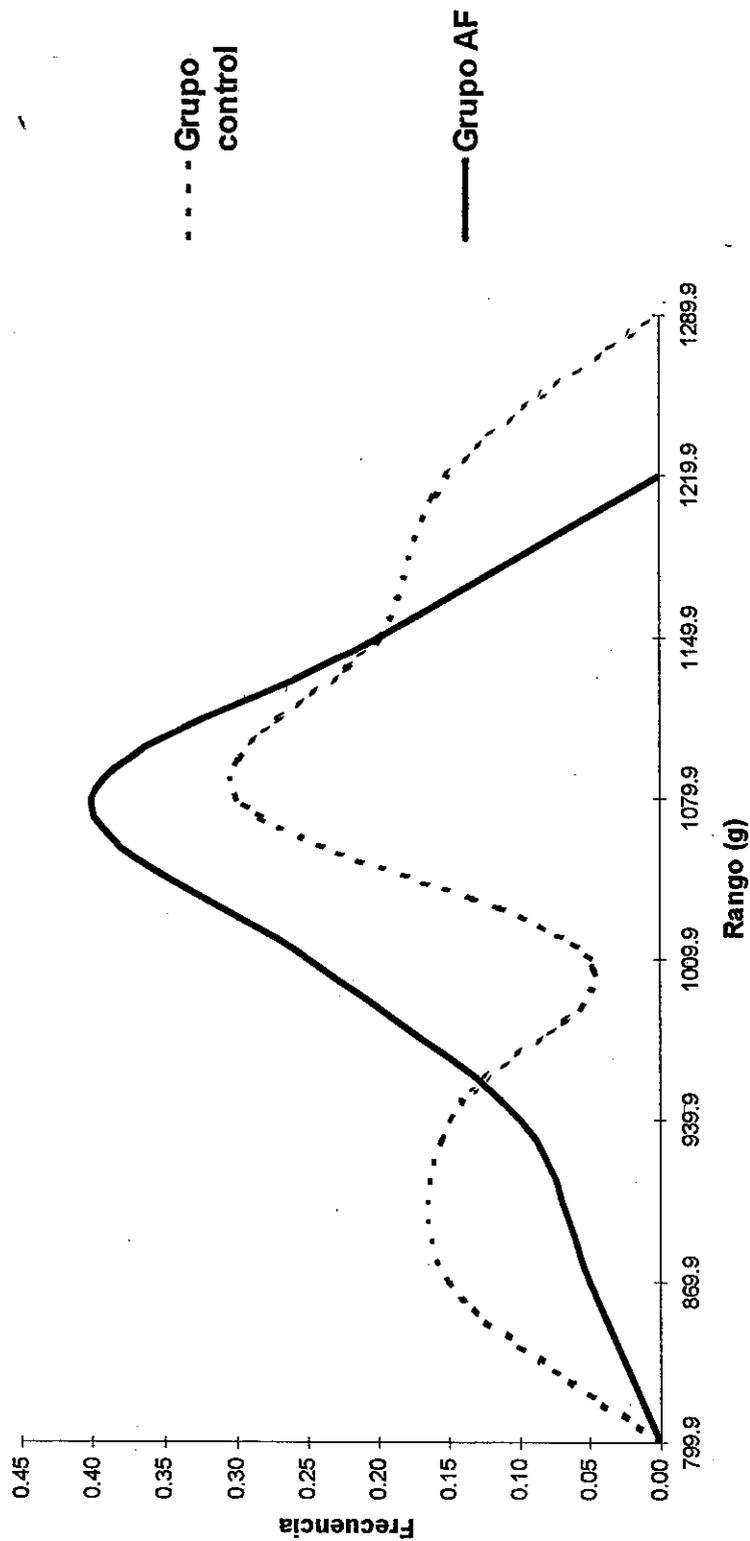
Grupo control (Dieta control), grupo AF (Alimento funcional suplementado con harina de *Aspergillus*)

¶ Rangos en gramos

* Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 3. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la uniformidad del peso corporal a los 27 días de edad en pollos de engorda neonatos



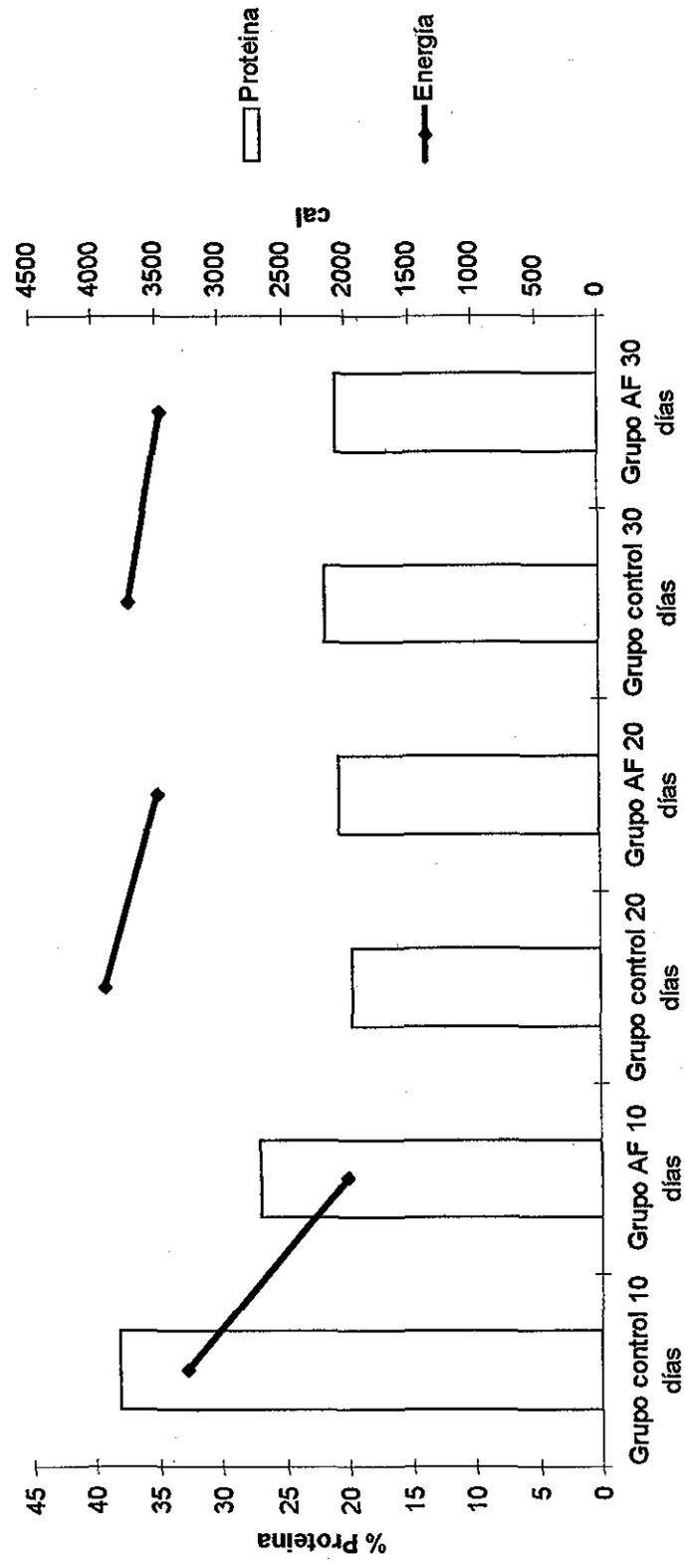
Grupo control (Dieta control), grupo AF (Alimento funcional suplementado con harina de *Aspergillus*)

*Rangos en gramos

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 4. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el la concentración de energía y proteína en el contenido de ileon de pollos de engorda neonatos



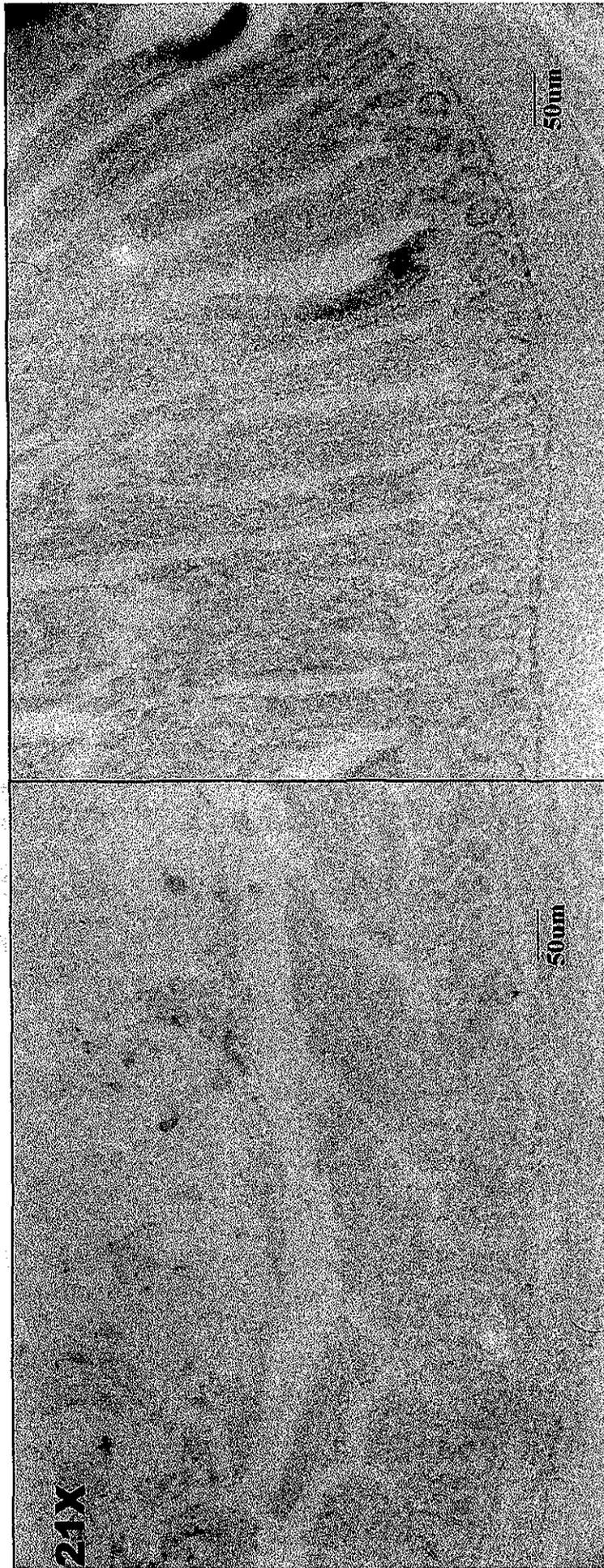
Grupo control (Dieta control), grupo AF (Alimento funcional suplementado con harina de *Aspergillus*). *Días de edad

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

Para la estimar la utilización de nutrientes, se analizó el porcentaje de proteína y calorías de energía presente en el contenido intestinal del ileon. Para este fin, se sacrificaron las aves por dislocación cervical y se tomó una muestra de contenido intestinal a 5 cm de la porción proximal de la unión ileo-cecal para determinar por el método de análisis químico proximal la contracción de proteína y calorías.⁵⁷

FIGURA 5. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el tamaño de la vellosidad de íleon a los 20 días de edad en pollos de engorda neonatos

Ileo día 20

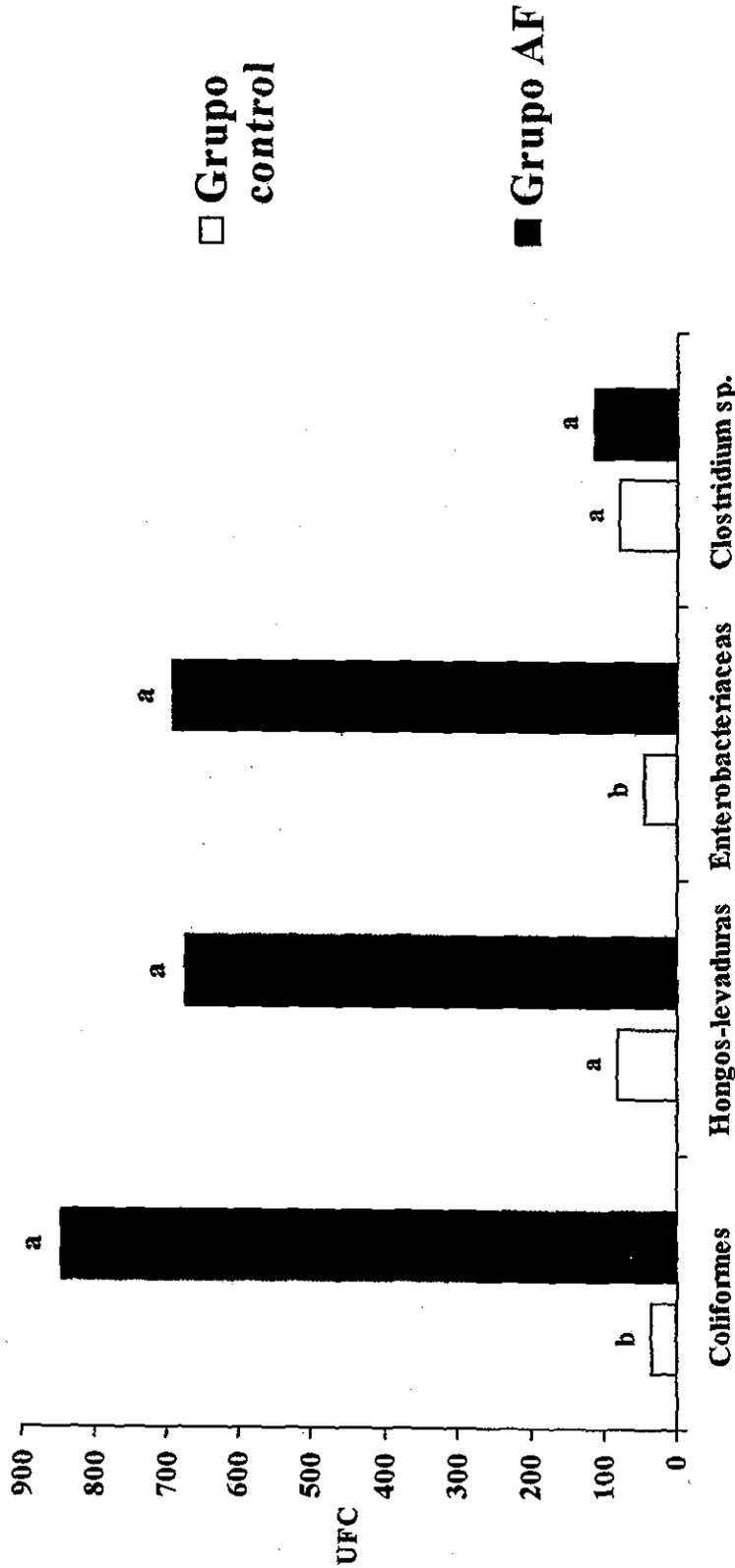


Dieta control

**Alimento funcional suplementado
con harina de *Aspergillus***

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 6. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre el número más probable de microflora intestinal aeróbica



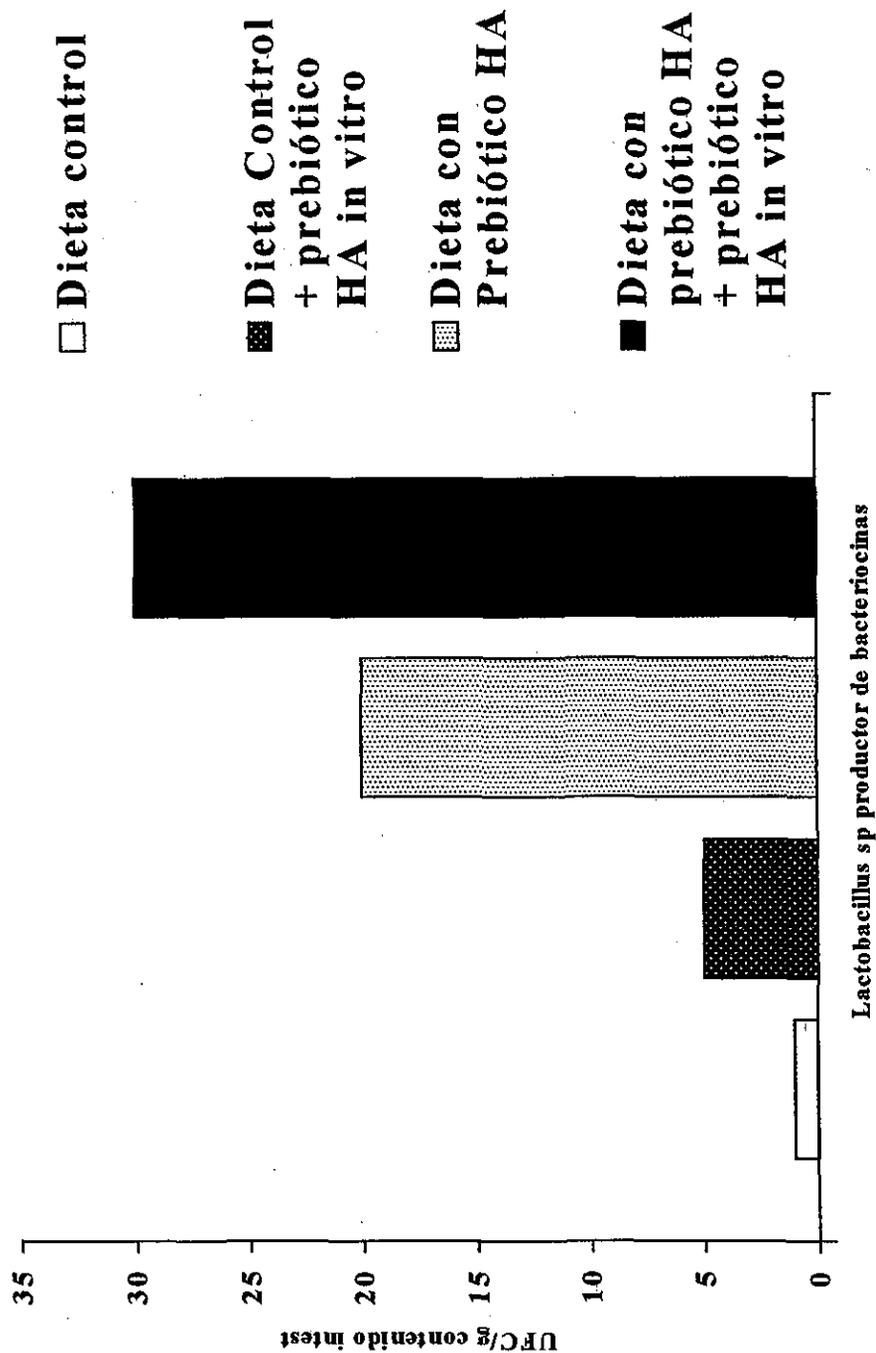
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Grupo control (Dieta control), grupo AF (Alimento funcional suplementado con harina de *Aspergillus*)

*HA = Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®); PeTAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA.

Para determinar el número más probable de microflora intestinal aeróbica, 1 gr de contenido intestinal fue diluido en caldo tioglicolato, se realizaron diluciones décuples seriadas y se cultivó en medios específicos para cada género bacteriano, se utilizó agar MacConkey para el aislamiento de coliformes, agar Sabouroud dextrosa para el aislamiento de hongos y levaduras, agar Tergitol 7 para el aislamiento de enterobacterias y agar SPS para el aislamiento de *Clostridium* sp. Las placas de agar fueron incubadas 24 horas a 37 C bajo condiciones de aerobiosis. Los medios de cultivo fueron examinados y las diferentes colonias de diferentes tipos fueron contadas.⁶³

FIGURA 7. Efecto de la administración del prebiótico harina de *Aspergillus* en la dieta (alimento funcional) y *in vitro*, sobre el número más probable de lactobacilos en el contenido intestinal



*HA = Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA. Para determinar el efecto de la dieta basal o el alimento funcional sobre la producción de metabolitos secundarios, se realizó el aislamiento del número más probable de microflora intestinal láctica en un medio específico (MRS, Difco, USA) para *Lactobacillus* sp, en condiciones de anaerobiosis. Las colonias aisladas, fueron desafiadas con microorganismos patógenos, siguiendo la metodología descrita por Gomez et al.⁶⁴

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

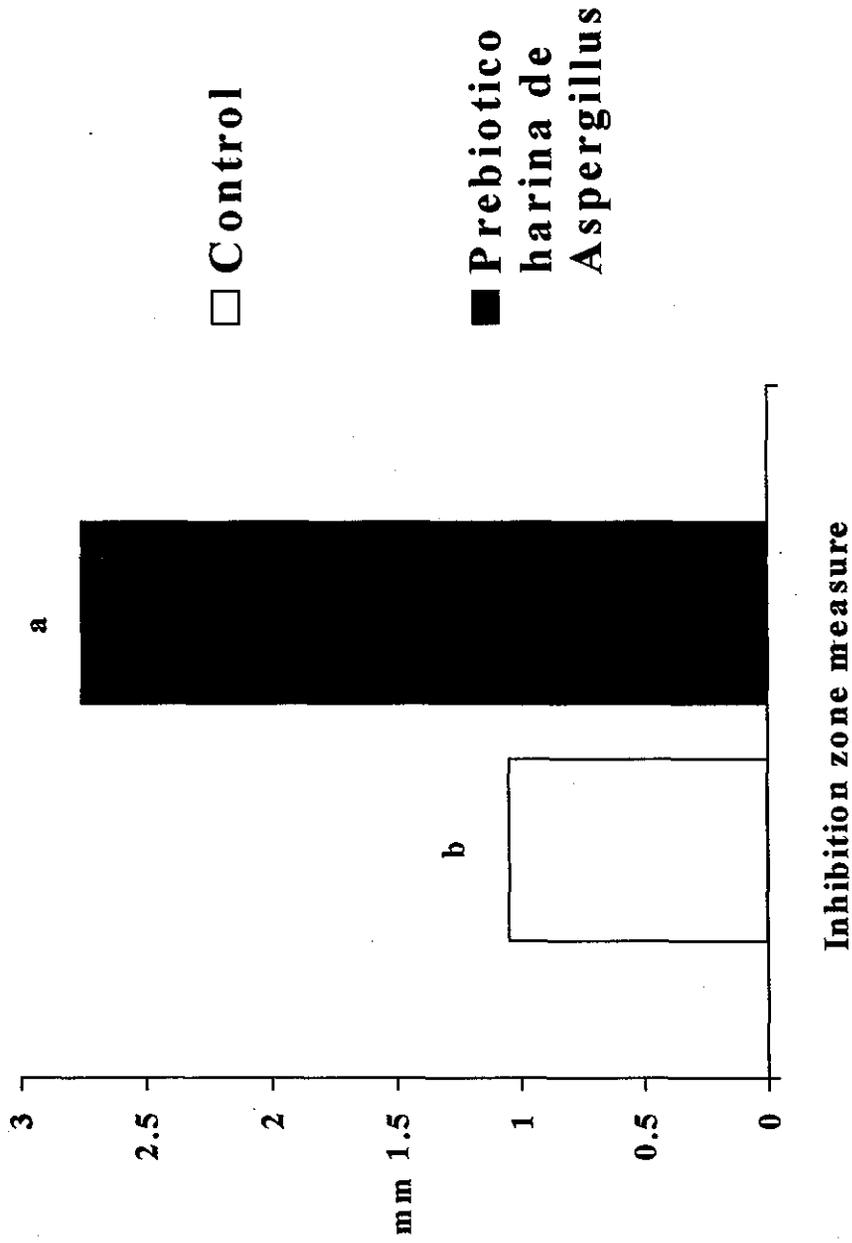
FIGURA 8. Efecto de la administración del prebiótico harina de *Aspergillus* en un cultivo de lactobacilos, sobre la síntesis de bacteriocinas in vitro



Fotografía de la zona de inhibición producida por el efecto antimicrobial de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* sp. Se cultivó la cepa de *Lactobacillus* sp aislada de intestino de pollo en medio de cultivo MRS a 37 C, durante 24 hr en condiciones de anaerobiosis. Después del tiempo de incubación, las bacteriocinas producidas por la cepa de *Lactobacillus* sp fueron recuperadas de acuerdo a la técnica descrita por Dabard et al., (2007).⁶⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

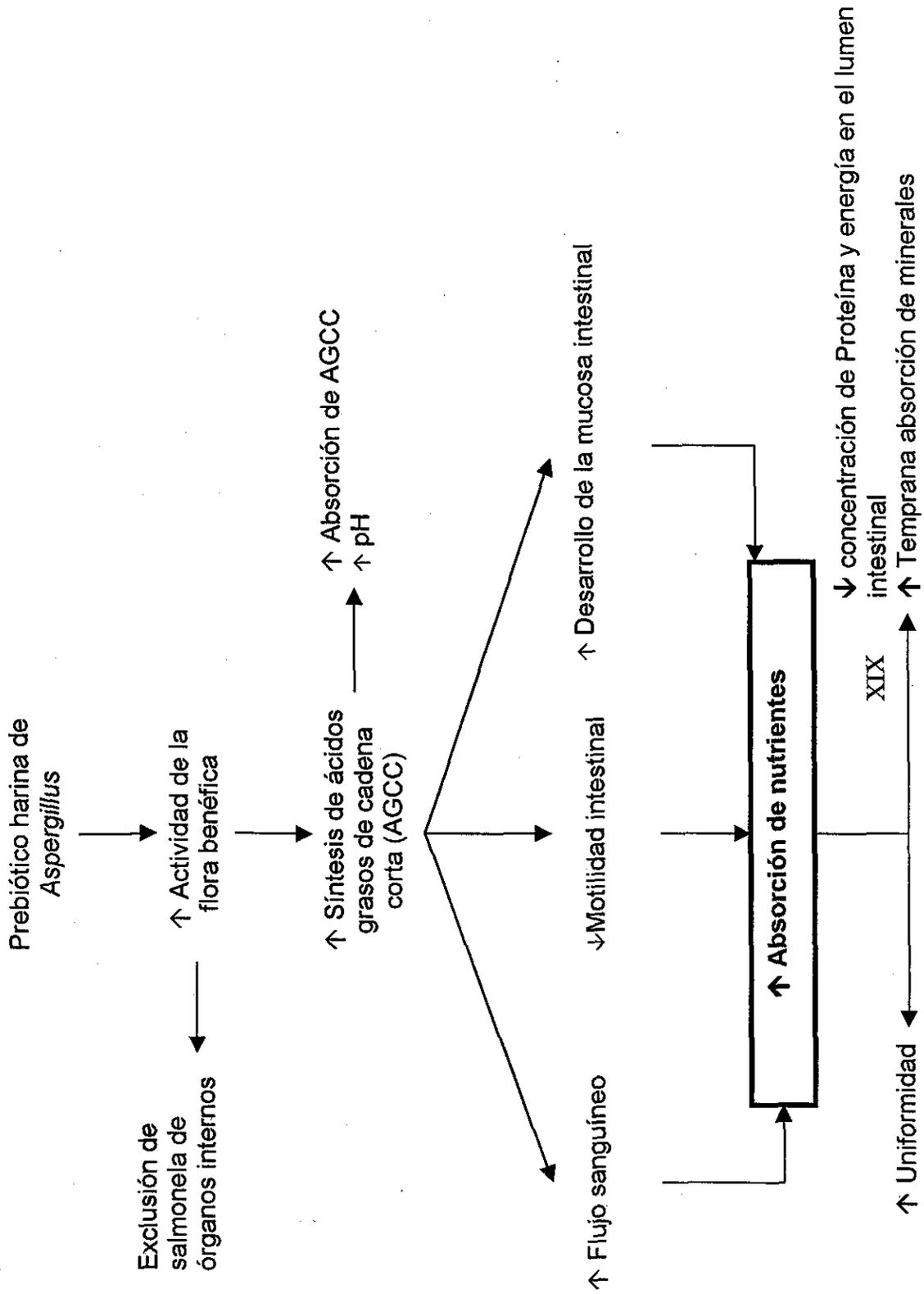
FIGURA 9. Efecto de la administración del prebiótico harina de *Aspergillus* en un cultivo de lactobacilos, sobre la síntesis de bacteriocinas in vitro



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Prebiótico Harina de *Aspergillus* (Fermacto®): PetAg Inc. Hampshire, IL 60140 USA. Para evaluar la SB, se cultivó la cepa de *Lactobacillus* sp aislada de intestino de pollo en medio de cultivo MRS a 37 C, durante 24 hr en condiciones de anaerobiosis. Después del tiempo de incubación, las bacteriocinas producidas por la cepa de *Lactobacillus* sp fueron recuperadas y desafiadas de acuerdo a la técnica descrita por Dabard et al., (2001).⁶⁵

FIGURA 10. Efecto de la administración de un alimento funcional suplementado con el prebiótico harina de *Aspergillus* sobre la fisiología y ecología del tracto intestinal de pollos de engorda neonatos



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN