



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE UN MANANO OLIGOSACÁRIDO SOBRE LA
COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DEL POLLO DE ENGORDA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ARIADNA PAOLA MÉRIDA CAAMAÑO

TUTOR:

MARÍA DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO

COMITÉ TUTORAL:

NATHALIE CABIROL

MARÍA TERESA CASAUBON HUGUENIN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

Gracias a Dios por darme la vida, la fuerza, y las oportunidades.

A mis dos grandes amores, Andrea y Rogelio. Son el motivo a que siga esforzándome para darles lo mejor de mí. Gracias por su amor.

A mi mamichi y papichi, gracias a ustedes he logrado llegar a este momento...los amo.

A mis hermanas Dianis y Florcín que me han brindado su apoyo siempre. Especialmente a ti Florcín por la asesoría técnica en cada tutorial y hasta el fin. Las amo.

A mi familia adoptiva que tanto quiero, gracias Sr. Rogelio, Sra. Chela, Paloma, Erick, y Oscar, porque sin su apoyo y cariño incondicionales no hubiera sido posible culminar este proyecto.

A mis abuelis, Foncha y Conchita. A mis tíos Mérida y tíos Caamaño con mucho amor porque ustedes estuvieron presentes en mi desarrollo personal y profesional.

Nava, gracias por impulsarme para iniciar esta aventura y por tus buenos consejos.

Con gran cariño a mis amigas Lula María y Tanis, por estar ahí siempre que las necesito.

A mis compañeros de maestría, Canela, Neri, Tania, Ubaldo, Wendy.

*La felicidad es algo que **no depende** de la **posición**,
sino de la **disposición***
John G. Pollard

AGRADECIMIENTOS

A

“Mi Alma Mater”

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
EXTENSIÓN EN PRODUCCIÓN AVÍCOLA
(CEIEPA_v)

Especialmente al MC. Ernesto Ávila y al MC. Benjamín Fuentes
por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

INSTITUTO DE INGENIERIA
Especialmente a la Dra. Nathalie Cabirol
por su apoyo y disposición incondicionales.

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

Dra. María del Pilar Castañeda, por aceptar que formara parte
de este proyecto.

Dra. María Teresa Casaubon, por su valiosa asesoría.

Dr. Carlos Eslava, por su tiempo y confianza.

*Bienaventurados los que saben **dar sin recordarlo,**
y **recibir sin olvidarlo***
Anónimo

RESUMEN

ARIADNA PAOLA MÉRIDA CAAMAÑO. Efecto de un manano oligosacárido sobre la composición de la microbiota intestinal y el comportamiento productivo del pollo de engorda. (Bajo la supervisión de **PhD. María del Pilar Castañeda Serrano, PhD. Nathalie Cabirol, PhD. Maria Teresa Casaubon Huguenin**).

El experimento fue diseñado para evaluar el efecto de un manano oligosacárido (MOS) sobre la composición de la microbiota intestinal y el comportamiento productivo del pollo de engorda. 486 pollos de 1 día de edad fueron asignados en 3 tratamientos con 6 réplicas cada uno. Los tratamientos fueron: 1) Control Negativo, dieta basal; 2) Control Positivo, dieta basal más antibiótico promotor (bacitracina 0.03%); y 3) MOS, dieta basal más Bio-Mos[®] (0.1%). El consumo de alimento, ganancia de peso, peso corporal e índice de conversión alimenticia fueron evaluados cada semana hasta el día 48 de edad. A los 7, 14, 21 y 45 días de edad, el contenido ileal y cecal fue analizado con las técnicas PCR-TGGE (electroforesis en gradiente de temperatura) para identificar la microbiota. Del patrón de bandas en el gel TGGE fueron identificadas las bacterias con el análisis de secuenciación. El tiempo de tránsito gastrointestinal (TTG) fue analizado a los 12, 24 y 36 días de edad. A los 49 días de edad fueron evaluados el rendimiento en canal, de la pechuga y la pierna con muslo así como el grado de pigmentación (amarillamiento (**b**)* y enrojecimiento (**a***)). Los resultados obtenidos sobre parámetros productivos no mostraron diferencia estadística entre tratamientos. El perfil de bandas TGGE del contenido cecal mostró mayor diversidad de comunidades bacterianas que el contenido ileal. El análisis de secuenciación indicó que las bacterias *Clostridium leptum*, *Ruminococcus gauvreaui*, *Lachnospiraceae*, *Clostridium sp.* fueron comunes a todos los tratamientos. No se observaron diferencias entre las dietas en el TTG con una media de 175 min. El rendimiento en canal, de la pechuga y la pierna con muslo no fue afectado por los tratamientos. El MOS presentó mayor grado de pigmentación (**b***) con respecto al control positivo ($P < 0.05$). Los resultados del presente estudio indicaron que la técnica PCR-TGGE fue una herramienta que pudo mostrar la diversidad de comunidades bacterianas en el intestino. Se mostró un efecto positivo del MOS sobre integridad intestinal que permitió una mejor deposición y absorción del pigmento.

Palabras clave: manano oligosacáridos, prebiótico, microbiota intestinal, pollo de engorda

CONTENIDO	página
Introducción	1
Revisión de Literatura	
1. Alimentos Funcionales	3
Prebióticos	3
Manano oligosacárido	4
Modo de acción	5
Efecto del MO en modelos biológicos	6
2. Microbiota intestinal	8
Actividad general	10
Métodos para el análisis de la microbiota	12
Composición de la microbiota intestinal del pollo de engorda	14
Manipulación de la microbiota intestinal	17
Justificación	19
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
Hipótesis	21
Material y Métodos	22
Resultados	29
Discusión	34
Conclusiones	43
Cuadros y Figuras	44
Literatura Citada.	54

CUADROS	página
1. Composición de la dieta basal para pollo de engorda	44
2. Efecto de la suplementación con MOS sobre el peso corporal (PC) y la ganancia de peso (GP) en pollos de engorda	45
3. Efecto de la suplementación con MOS sobre el consumo de alimento y el índice de conversión alimenticia en pollos de engorda	46
4. Efecto de la suplementación con MOS sobre el rendimiento en canal, el rendimiento de la pechuga y el rendimiento de la pierna con muslo	47
5. Efecto de la suplementación con MOS sobre el grado de pigmentación del pollo de engorda	48
6. Tiempo de tránsito gastrointestinal (TTG) en el pollo de engorda de diferentes edades	49

FIGURAS	página
1. Estructura química de las porciones manano y glucano de la pared Celular de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	50
2. Modo de acción del manano oligosacárido.	51
3. Patrón de bandas en el gel de la electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE) obtenido de muestras del contenido ileal en pollos.	52
4. Patrón de bandas en el gel de la electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE) obtenido de muestras del contenido cecal en pollos	53

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos han provisto de innumerables beneficios al hombre y a los animales domésticos durante los últimos 50 años. En este período se han utilizado más de un millón de toneladas de antibióticos en la biosfera, sus principales usos son terapéuticos en el hombre y sus mascotas, como antibióticos promotores de crecimiento (APC) y profilaxis en los animales domésticos en producción (Hinton, 1986¹). La inclusión de antibióticos en dietas de pollo de engorda con dosis subterapéuticas con el fin de lograr mejores velocidades de crecimiento, ha llegado a ser una práctica común en la industria avícola (Fairchild *et al.*, 2001²; Foster, 1972³)

Los APC están recientemente bajo escrutinio científico, público y político por el hecho de la selección de genes de resistencia a los antimicrobianos en poblaciones de agentes patógenos en animales y humanos (Owens *et al.*, 2004⁴; Parks *et al.*, 2005⁵) e incluso en la microbiota no patógena de animales expuestos. Al respecto, se han aislado enterococos resistentes a vancomicina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a enrofloxacin en animales de producción (Bates *et al.*, 1994⁶). La posibilidad de resistencia bacteriana, y por otro lado los efectos de residuos de antibiótico en los alimentos, han impulsado en algunas regiones de los Estados Unidos de América y la unión Europea entre otras muchas comunidades a escala mundial, en prohibir el uso de la mayoría de los APC (Sims *et al.*, 2004⁷). Las estrategias para reducir el uso de antibióticos en la industria avícola incluyen aspectos de bioseguridad, vacunación, selección genética, nutrición. Los últimos avances en biotecnología apoyan la hipótesis de que la dieta modula funciones del organismo que son importantes para la vida, además de proveer los nutrientes necesarios para el desarrollo de los individuos (Roberfroid, 2000⁸). Los productos que se han desarrollado como alternativa para no utilizar los APC incluyen alimentos funcionales que contienen aditivos como los acidificantes, enzimas, probióticos, prebióticos que se encuentran en investigación intensiva en estas últimas dos décadas (Guo *et al.*, 2004⁹; Manzanilla *et al.*, 2004¹⁰; Owens *et al.*, 2004⁴).

Los prebióticos son ingredientes no digeribles del alimento que confiere beneficios de salud y bienestar a su hospedero por la estimulación selectiva del crecimiento o actividad

metabólica de un número limitado de microorganismos intestinales (Gibson y Roberfroid, 1995¹¹). El prebiótico a base de manano oligosacárido (MOS) es sintetizado a partir de la pared celular externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y fue introducido como aditivo en la alimentación de las aves hace 15 años (Shashidara y Devegowda, 2003¹²; Zdunczyk *et al.*, 2005¹³). El MO no estimula selectivamente alguna población bacteriana benéfica, se piensa que podría favorecer el desarrollo de este tipo de poblaciones al haber disponibilidad de receptores y nutrientes en el intestino, lo anterior por el hecho de que el MO inhibe la adhesión de enterobacterias fimbria tipo 1 al epitelio intestinal. Algunas investigaciones, han demostrado que la suplementación de pollos de engorda con MO los cuales se desafiaron con diferentes serovariedades de *Salmonella enterica*, disminuyó la colonización y concentración de *Salmonella* en el contenido del ciego de estas aves (Spring *et al.*, 2000¹⁴; Fernández *et al.*, 2002¹⁵)

Las especies bacterianas difieren en relación a sus preferencias de sustratos y a sus necesidades para el crecimiento. La composición química y la estructura de la digesta determinan ampliamente la distribución de la comunidad microbiana en el tracto intestinal (Wagner y Thomas 1987¹⁶; Savoie, 1992¹⁷). Los cambios en la composición de la microbiota intestinal de los animales pueden tener efectos benéficos o detrimentales sobre la salud, crecimiento, y maduración del animal hospedero. Por ello, la importancia de evaluar el efecto de prebióticos como el MO sobre el desarrollo de la microbiota intestinal. El impacto del desarrollo de la microbiota requiere consideración especial cuando se le analiza dentro del contexto de la producción animal, cuyo principal objetivo es la eficiencia en el crecimiento (Gaskins, 2005¹⁸).

REVISIÓN DE LITERATURA

1. ALIMENTOS FUNCIONALES

Un alimento se considera como funcional cuando beneficia a una o más funciones específicas en el cuerpo más allá de los efectos nutricionales requeridos; proporcionando un estado de bienestar y salud al reducir el riesgo de enfermedad. Así mismo, un alimento puede ser considerado como funcional si contiene un macronutriente esencial que tiene efectos fisiológicos específicos (como los polisacáridos del almidón, los ácidos grasos omega 3) o bien, si un micronutriente esencial se consume por arriba de la recomendación diaria. Adicionalmente, también podría ser un ingrediente del alimento el cual su valor nutritivo no es reconocido como esencial (algunos oligosacáridos) o si carece de valor nutricional (bacterias vivas y fitoquímicos) (Roberfroid, 1999¹⁹, Silveira *et al.*, 2003²⁰).

Los alimentos funcionales (AF) ejercen su acción sobre diferentes sistemas, especialmente en el tracto gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico.

Entre los principales objetivos del desarrollo de AF es favorecer la fisiología del intestino; así como, la composición y la actividad del ecosistema microbiano que lo coloniza. Uno de los productos más usados en la formulación de los AF son los prebióticos.

1.1 Prebióticos.

La clasificación de un alimento o un ingrediente del alimento como prebiótico requiere cumplir los siguientes criterios; 1) resistir a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas de mamíferos y a la absorción gastrointestinal, 2) ser fermentado por la microbiota intestinal, y 3) estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con salud y bienestar (Collins y Gibson, 1999²¹; Audisio *et al.*, 2001²²; Cummings *et al.*, 2001²³).

Los carbohidratos, especialmente oligosacáridos y polisacáridos, han sido empleados como prebióticos. Los prebióticos son obtenidos a partir de las plantas, por medio de la hidrólisis controlada de polisacáridos naturales o bien por la síntesis enzimática de un disacárido utilizando hidrolasas y/o glicosiltransferasas (Grizard y Barthelemy, 1999²⁴).

Son clasificados principalmente por el monómero –osil que los compone. Los oligosacáridos “no digestibles” (OND) incluidos los que contienen fructosa, manosa, glucosa, xilosa, galactosa, lactulosa, sacarosa son los compuestos más utilizados como prebióticos en la industria alimenticia (Audisio *et al.*, 2001²²; Flickinger y Fahey, 2002²⁵; Kolida y *et al.*, 2002²⁶; Patterson y Burkholder, 2003²⁷). Cummings *et al.*, (2001)²³ explican que es preferible nombrar a los OND como carbohidratos resistentes de cadena corta (CCC) debido a que no siempre se cumple con la estructura de un oligosacárido (unión de 2 a 10 monosacáridos por enlace glicosídico) ni tampoco con la condición de indigestibilidad. Es necesario indicar el grado de polimerización de estos CCC (2 ó más).

Los prebióticos tienen efecto sobre las funciones gastrointestinales pero no debido a sus propiedades físico-químicas, sino por sus atributos bioquímicos y fisiológicos. También están clasificados como compuestos de fibra dietética por incrementar el volumen fecal y el contenido de agua en heces, por lo que mejoran la frecuencia, y consistencia de las heces. (Salminen *et al.*, 1998²⁸; Audisio *et al.*, 2001²²). Dentro de los efectos benéficos atribuidos a los prebióticos tenemos: a) incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Campbell *et al.*, 1997²⁹); b) estimulación del crecimiento y/o actividad de bacterias ácido lácticas (Kleessen *et al.*, 1997³⁰); c) mejora de la biodisponibilidad de minerales (Van Loo *et al.*, 1999³¹); d) reducción de niveles de triglicéridos y colesterol en suero (Kok *et al.*, 1998³²); e) disminución del riesgo de cáncer (Reddy *et al.*, 1997³³).

La investigación del efecto benéfico de los prebióticos sobre el estado de salud para el hospedero está directamente enfocada a las poblaciones de la microbiota intestinal, su actividad, interacciones y por modular la función intestinal.

1.1.1 Manano oligosacárido.

Químicamente, el manano que constituye la pared de la levadura *S. cerevisiae* tiene dos tipos de sacáridos unidos a una proteína. La primera glicoproteína está compuesta de una cadena corta de oligosacáridos unidos a residuos de Serina o Treonina. La segunda glicoproteína, tiene en el centro 2N-acetilglucosamina y cerca de 12 residuos de manosa, y en el extremo una cadena externa de 100 a 150 residuos de manosa unida al aminoácido Asparragina (Parodi, 1981³⁴). Figura 1.

1.1.1.1 MODO DE ACCIÓN.

La adherencia de las bacterias a las células del hospedero les da protección contra los mecanismos de limpieza que operan en las superficies mucosas (fluidos, movimientos de barrido) y al mismo tiempo incrementa su habilidad para colonizar el epitelio, multiplicarse e invadir las células. El principal mecanismo de adhesión expresado por numerosas bacterias, es por medio de lectinas. Las lectinas son proteínas de origen no inmunológico, que se unen específicamente a carbohidratos complementarios presentes en la superficie de las células del huésped. La mayoría de las lectinas bacterianas se localizan en los apéndices filamentosos de la superficie de la bacteria llamadas fimbrias o pili. Un solo tipo de bacteria puede expresar en su superficie más de una lectina (Sharon, 1987³⁵; Sharon, 2006³⁶)

Las lectinas tienen una alta especificidad por un determinado carbohidrato y está directamente relacionado con el tropismo de la bacteria hacia su órgano blanco. Duncan *et al.* (2005³⁷) observaron que *E.coli* ORN13 se adhiere bien a las células epiteliales de la vejiga de ratones y moderadamente a las células del intestino de estos animales. Y que en contraste, *S. typhimurium* 6704 mostró mínima adhesión a las células de la vejiga pero se unió muy bien a las células del epitelio intestinal.

Existen varios tipos de fimbria con respecto a su estructura y especificidad por el carbohidrato. Han sido definidas como tipo 1, tipo G, tipo P, tipo 2, tipo 5, tipo S, K99. A estas estructuras también se les nombra adhesinas o aglutininas. La fimbria tipo 1 es producida por una gran número de cepas de *E. coli* y también por otras especies de enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. Estas bacterias se han clasificado como manosa específica y preferencialmente unen sus lectinas con glicoproteínas que están conformadas por estructuras tales como cadenas cortas de oligomanosa o N-acetilglucosamina. Estas estructuras son constituyentes comunes de las superficies celulares de muchas células eucariotas, incluyendo la levadura *S. cerevisiae* (Sharon y Lis, 2004³⁸). En la investigación de Duncan *et al.* (2005³⁷) demostraron que 2 tipos de bacterias fimbria tipo 1 se unieron a las glicoproteínas del manano de *S. cerevisiae*. *Salmonella* se unió rápidamente a estas glicoproteínas, mientras que *E. coli* lo hizo de manera más lenta.

Si las bacterias fimbria tipo 1 se adhieren a las glicoproteínas del manano no atacan la pared celular del intestino, no colonizan y son expulsados del intestino junto con las heces. (Figura 2). El efecto de protección anti adhesiva de los carbohidratos ha sido demostrado en una gran diversidad de investigaciones realizadas en diferentes especies animales y con diferentes especies patógenas (Sharon, 2006³⁶). En su experimento Oyofu *et al.* (1989^{39,40}) adicionaron diferentes azúcares en el agua de bebida de pollos de engorda. El grupo de aves al que se le proporcionó el azúcar manosa y que fue desafiado contra *S. typhimurium* mostró el menor grado de infección ($P < 0.05$) así como el número significativamente más bajo de *Salmonellas* viables por gramo de contenido cecal.

Otro mecanismo de acción relacionado con el manano oligosacárido es la modulación del sistema inmune pero no está bien dilucidada. Una de las hipótesis es que el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) detecta la presencia de microbios por medio del reconocimiento de moléculas presentes únicamente en estos microorganismos las cuales no están relacionadas con células del hospedero. Estas moléculas microbianas son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos. En éstos se incluye los componentes manano y glucano de la pared celular de la levadura y otras moléculas de microorganismos como los son peptidoglicanos, lipopolisacáridos, y glicolípidos. Los patrones moleculares de *S. cerevisiae* (el manano y el glucano) son reconocidos por varios receptores que se encuentran en las células de defensa del GALT y se activa la respuesta inmune tal como la fagocitosis, la vía alterna del complemento y la vía de la lectina. Shashidara y Devegowda, (2003¹²) citan a Salyers y Whitt (1994).

En gallinas reproductoras suplementadas durante dos semanas con el aditivo MO (0.5g/kg) fueron inmunizadas contra el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio. Cuatro semanas después se midieron los títulos de anticuerpos contra esta enfermedad y en este grupo de aves se obtuvieron significativamente títulos más altos (Shashidhara y Devegowda, 2003¹²)

1.1.1.2 EFECTO DEL MO EN MODELOS BIOLÓGICOS.

Se han llevado a cabo estudios donde se ha evaluado el efecto del aditivo con base a MO (Bio-Mos®, producto comercial) sobre el crecimiento de algunos animales domésticos con

resultados variables. En pavos, por ejemplo, se ha demostrado que variables tales como el consumo de alimento (CA), el índice de conversión (IC) no se vieron influenciadas por la adición de diferentes niveles de inclusión (0.1%, 0.25%, 0.5%) de Bio-Mos®; así tampoco el peso corporal (PC) hasta las 8 semanas de edad del pavo (Juskiewicz *et al.*, 2003⁴¹; Zdunczyk *et al.*, 2004⁴²; Zdunczyk *et al.*, 2005¹³). Sin embargo, este último parámetro mejoró significativamente después de la 16ª. semana de edad con la dosis intermedia de inclusión de Bio-Mos® en la dieta. Empero, otros investigadores han encontrado un efecto positivo sobre parámetros productivos en pavos suplementados con este aditivo a una inclusión del 0.1% (Fairchild *et al.*, 2001²; Sims *et al.*, 2004⁴³). En lechones recién destetados suplementados con Bio-Mos®, se ha observado un efecto negativo sobre el consumo de alimento y la ganancia diaria de peso (White *et al.*, 2002⁴⁴; Burkey, 2004⁴⁵) y en contraste, en otro trabajo, se demostró que este producto mejoró la GP y la conversión de alimento. En vaquilla para reemplazo, la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia fueron mejores cuando se utilizó el aditivo MOS (Terré *et al.*, 2006⁴⁶). También se ha evaluado el efecto de la suplementación con Bio-Mos® en perros. Se demostró que la materia seca consumida, la materia seca ileal y fecal, así como la digestibilidad de macronutrientes no fueron afectados por este prebiótico (Strickling *et al.* 2000⁴⁷; Swanson *et al.*, 2002⁴⁸).

En diferentes investigaciones se ha reportado el efecto del MOS sobre la morfología intestinal. Se ha observado un incremento de la largura de las vellosidades del yeyuno e íleon en pollos alimentados con Bio-Mos® (Iji *et al.*, 2001⁴⁹; Zhang *et al.*, 2005⁵⁰) y cuando se adicionó un simbiótico (Bio-Mos® más un probiótico) hubo efecto de interacción entre la dieta y la edad del pollo (49 días) en la largura de las vellosidades del duodeno e íleon. En esta última región del intestino delgado fueron significativamente más grande la profundidad de las criptas y la relación largura de vellosidad/profundidad de cripta lo cual indica mayor superficie para el proceso de absorción de nutrientes (Sun *et al.*, 2005⁵²; Zhang *et al.*, 2005⁵⁰). Iji *et al.* (2001⁴⁹) determinaron que hubo cambios significativos en la concentración de ARN así como en las proporciones de ARN/proteína, proteína/ARN y ARN/ADN en el íleon. Los cambios en estas moléculas son indicativos de que se están llevando a cabo procesos de la función intestinal tales como la digestión y el

transporte de nutrientes. Lo anterior se corroboró en este mismo experimento al encontrar un aumento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo y un aumento en la cantidad de L-triptofano absorbido en el yeyuno con la suplementación de MOS en pollos de 21 días de edad. En otro estudio donde se evaluó el efecto de la suplementación con el aditivo MOS sobre la integridad intestinal, las aves de 42 días de edad tuvieron el mayor número de células caliciformes en la vellosidad (Baurhoo *et al.*, 2007⁵³). Las células caliciformes sintetizan y secretan las muco proteínas que conforman la capa de moco que cubre el epitelio del tracto intestinal. Esta capa de moco actúa como un medio protector de la mucosa intestinal contra el daño ocasionado por sustancias químicas o por microorganismos patógenos y tiene influencia entre el transporte del contenido luminal y la membrana del borde de cepillo (Uni *et al.*, 2003⁵¹). Por otro lado, no se ha encontrado efecto de los MOS sobre el peso relativo (PR) (g/Kg de PC) del ventrículo, intestino delgado, ciego, páncreas o del hígado. (Iji *et al.*, 2001⁴⁹; Zdunczyk *et al.*, 2005¹³). Cuando se incrementa el nivel de inclusión de MOS (0.5%) aumenta significativamente el PR del ciego de pavos (Zdunczyk *et al.*, 2004⁴²).

2. MICROBIOTA INTESTINAL

El TGI es el principal órgano de digestión, absorción y simultáneamente contiene una extensa variedad de especies microbianas referidas como microbiota gastrointestinal. Ésta representa todos los principales grupos de microbios predominando las bacterias. El número de células bacterianas es 10 veces superior al número de células de todo el animal huésped y ejerce una profunda influencia sobre los procesos inmunológicos, nutricionales, fisiológicos y de protección del animal que las alberga (Salminen *et al.*, 1998²⁸; Gaskins, 2005¹⁸). Esta relación de comensalismo se ha seleccionado a través del tiempo evolutivo, dando como resultado una microbiota estable en los animales maduros que generalmente es similar tanto en composición (aproximadamente 400 especies dominantes de bacterias) como en función (Nord *et al.*, 1984⁵⁴; Edwards y Parret, 2002⁵⁵; Gaskins, 2005¹⁸). Las poblaciones que constituyen a la microbiota intestinal tienen interacciones complejas entre ellas y con las células del epitelio intestinal (Vaughan *et al.*, 2002⁵⁶). La comunidad

bacteriana en un momento de tiempo dado, refleja la capacidad de cada grupo bacteriano para competir frente a otros grupos y frente al sistema de defensa del huésped en determinadas condiciones físicas y químicas del medio.

A pesar de la estabilidad evolutiva, la microbiota intestinal se desarrolla en los individuos siguiendo un patrón característico de sucesos que requiere la adaptación sustancial del huésped durante las primeras etapas de su vida (Gaskin, 2005¹⁸) Por lo tanto es de gran importancia obtener más información sobre los mecanismos de colonización de las bacterias intestinales tales como las propiedades de adhesión, componentes de las membranas, utilización de substrato y metabolismo de crecimiento. En el tracto gastrointestinal las bacterias pueden encontrarse en el lumen, en la capa de moco o al glicocalix, a las partículas del alimento o a los residuos digestivos (Macfarlane y Macfarlane, 1997⁵⁷; Dunne, 2001⁵⁸).

Los mecanismos de colonización de la microbiota pueden estar influenciados por factores externos o internos del hospedador. Los factores externos son: medioambiente, densidad bacteriana, dieta, hábitos alimenticios, y estrés. Los internos son los relacionados con el huésped: edad, fisiología, genética, metabolismo, por ejemplo, el pH intestinal, temperatura corporal, peristálsis, producción de ácidos biliares, secreciones, respuesta inmune y los receptores de la mucosa para las bacterias (Collins y Gibson, 1999²¹; Mackie *et al.*, 1999⁵⁹, Vaughan *et al.*, 2002⁵⁶). Algún ejemplo de los factores externos son señalados en los estudios realizados por Lan *et al.* (2004⁶⁰) quienes observaron que en los pollos bajo condiciones de estrés calórico, la microbiota del yeyuno se modifica. Mientras que la cantidad de algunas especies como *Lactobacillus agilis* aumenta otras como *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* desaparecen.

La adherencia de unas bacterias con otras forma microcolonias, permitiendo así el desarrollo de un “estrato bacteriano”, el cual inicialmente puede estar compuesto de una sola especie, pero que frecuentemente evoluciona a una comunidad compleja de diferentes especies bacterianas (Klessen y Blaut, 2005⁶¹). La distribución de especies de bacterias es característica en cada región del tracto gastrointestinal. En el estómago e intestino delgado hay poca densidad bacteriana debido al pH bajo y al tránsito intestinal rápido. El íleon presenta mayor densidad de bacterias y más diversidad que en la parte anterior del

intestino. El intestino grueso y el ciego son el principal sitio de colonización, contiene el mayor número de bacterias, bajo potencial oxido-reducción y altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (Mackie *et al.*, 1999⁵⁹; Manzanilla *et al.*, 2004¹⁰).

2.1 Actividad General.

En la microbiota intestinal encontramos dos tipos principales de bacterias: 1) Autóctonas o indígenas que son ubicuas en el tracto gastrointestinal y ocupan todos los hábitat y nichos disponibles, ejemplo de este tipo de bacterias son las ácido lácticas y las bifidobacterias 2) las aloautóctonas que son especies de bacterias que se encuentran en un hábitat en el que usualmente no están establecidas, generalmente provienen de otro hábitat gastrointestinal u órgano del huésped, o bien son introducidas por la influencia de un factor externo de colonización como puede ser el agua y el alimento (Mackie *et al.*, 1999⁵⁹; Vaughan *et al.*, 2002⁵⁶; Dunne, 2001⁵⁸).

Algunas bacterias del intestino son potencialmente benéficas mientras que otras pueden ser dañinas. Las bacterias pueden causar daño en el intestino a través de la producción de toxinas que provocan diarrea, por invasión de la mucosa o bien, por la activación de células cancerosas (Salminen, *et al.*, 1998²⁸). Las bacterias benéficas incluyen principalmente las bifidobacterias y lactobacilos. Los lactobacilos mantienen saludable el intestino delgado (Manzanilla *et al.*, 2004¹⁰; Klessen y Blaut, 2005⁶¹) y en conjunto con la microbiota cecal controlan los grupos patógenos evitando las infecciones (Klessen *et al.*, 2001⁶², Klessen y Blaut, 2005⁶¹). Los mecanismos por los cuales estas bacterias constituyen una barrera para la invasión de patógenos son: 1) productos finales de su metabolismo, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC); 2) competencia por sitios de colonización; 3) antagonismo a través de la excreción de productos antimicrobianos o bacteriocinas; 4) competencia por nutrientes; y 5) estímulo antigénico para el sistema inmune (Nord *et al.*, 1984⁵⁴; Gibson *et al.*, 2005⁶³).

La microbiota intestinal tiene como función principal el proceso de fermentación para obtener energía de los carbohidratos que no fueron degradados por enzimas pancreáticas en el intestino. A través de este proceso, el crecimiento bacteriano es estimulado (biomasa), y son producidos AGCC, y los gases H₂, CO₂ y CH₄. Las proteínas y los aminoácidos pueden

ser también sustratos para las bacterias. Los ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) (el isobutirato, 2-metil-butirato e isovalerato) son productos finales de la fermentación de aminoácidos. Otros productos finales del metabolismo de proteínas incluyen NH_3 , fenoles, indoles y aminas (Salminen, *et al.*, 1998²⁸).

Los AGCC son acetato, propionato y butirato, pero otros productos finales significativos de la fermentación de carbohidratos incluyen lactato, etanol, succinato, formiato, caproato. Los AGCC son rápidamente absorbidos en el intestino grueso y estimulan el mecanismo para la absorción de agua. La composición de la dieta tiene influencia en la proporción de las concentraciones producidas de estos ácidos. Los AGCC son metabolizados en el epitelio intestinal, en el hígado y el músculo, regularmente no se excretan en la orina y se detectan en pequeñas cantidades en las heces. Una de las propiedades más importantes de los AGCC es su aporte de energía para el epitelio intestinal. La producción de AGCC ejerce un efecto inhibitorio contra bacterias patógenas al establecerse un ambiente con pH bajo (Nord *et al.*, 1984⁵⁴; Salminen *et al.*, 1998²⁸). Van Der Wielen *et al.* (2000⁶⁴) que estudiaron cómo estos AGCC tienen un papel importante en el desarrollo de la microbiota cecal encontraron que existe correlación negativa entre el número de *Enterobacteriaceae* y la concentración de acetato ($P < 0.05$, $r = -0.593$).

El acetato es el principal AGCC. El acetato es utilizado por varios tejidos del organismo para obtener energía. El propionato es el principal precursor de glucosa en los animales rumiantes. El ácido propiónico y el acético reducen los niveles de colesterol en el plasma. El ácido butírico aporta el 50% de los requerimientos de energía para los enterocitos y regula el crecimiento y diferenciación de las células del epitelio intestinal (Tuohy *et al.*, 2005⁶⁵).

En general no se ha encontrado efecto de los MOS sobre las concentraciones de AGCC ni sobre el total de AGCR. Tampoco en las concentraciones de amonio y nitrógeno (Spring *et al.*, 2000¹⁴; Strickling *et al.*, 2000⁴⁷; Swanson *et al.*, 2002⁴⁸; Juskiewicz *et al.*, 2003⁴¹). Juskiewicz *et al.* (2003) encontraron en sus estudios con pavos, que al adicionar el Bio-Mos® al 0.1% se producen principalmente el acetato en una proporción del 79%, propionato (5-6%), butirato (11%) y en pequeñas cantidades el valerato. Estas proporciones se consideran dentro del rango normal en esta especie. A las dosis de 0.25% y 0.5% se

llegan a incrementar la concentración total de AGCC, AGCR y el butirato en el ciego (Zdunczyk *et al.*, 2004⁴²). Un estudio discrepa de los resultados anteriores pues se halló que a mayor nivel de inclusión de los MOS disminuyó la concentración de estos ácidos (Zdunczyk *et al.*, 2005¹³).

La inclusión del aditivo Bio-Mos (0.1%) en el alimento de pavos no ha mostrado un efecto sobre la actividad glicolítica bacteriana en el ciego, especialmente en la actividad de las enzimas que liberan las bacterias tales como α -, β - glucosidasa; α -, β -galactosidasa; y β -glucoronidasa lo cual sugirió que existe poca fermentación de la microbiota cecal. (Juskiewicz *et al.*, 2003⁴¹; Zdunczyk *et al.*, 2005¹³) Se ha reportado que las enzimas β -glucoronidasa y β -glucosidasa han sido involucradas en la activación de carcinógenos y otras sustancias tóxicas en el intestino grueso (Edwards y Parret, 2002⁵⁵).

Por otro lado, la interacción de las bacterias con la capa de moco que cubre el epitelio intestinal juega un rol importante para la integridad de la “barrera de la mucosa” e influye sobre su propiedad protectora. Una disrupción de la estructura de la microbiota, la capa de moco o las células epiteliales, provocaría que antígenos y otras sustancias dañinas intraluminales afecten la barrera de la mucosa y ocasionen un incremento de la permeabilidad de la mucosa (Klessen y Blaut, 2005⁶¹, Smirnov *et al.*, 2005⁶⁶). Otros de los efectos benéficos del desarrollo de la microbiota están la tolerancia a los antígenos del alimento, desarrollo de la inmunidad (estímulo antigénico) y el mantenimiento de los niveles de producción de enzimas del borde de cepillo (Collins y Gibson, 1999²¹; Vaughan *et al.*, 2002⁵⁶; Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004⁶⁷).

2.2 Métodos para el Análisis de la Microbiota.

Los estudios realizados acerca de la microbiota en varias especies animales y en una diversidad de hábitat sugieren que sólo una porción de la comunidad microbiana se aísla eficientemente cuando se usan técnicas clásicas de cultivos microbianos. Existen pocos métodos disponibles para monitorear toda la ecología del tracto digestivo. La mayoría de las bacterias que crecen en una comunidad tan compleja dependen de factores de crecimiento abastecidos por otros microorganismos o de secreciones de los tejidos del huésped. Debido a la complejidad de estos factores es común que sólo menos del 10% de

las bacterias que se localizan en el intestino puedan ser cultivadas en condiciones de laboratorio. La mayoría de los trabajos y conclusiones obtenidas hasta la actualidad reflejan sólo los cambios de miembros minoritarios de la microbiota (Apajalahti y Kettunen, 2002⁶⁸).

Actualmente se utilizan técnicas que analizan los ácidos nucleicos (ADN y ARN), base del material genético en las células bacterianas para caracterizar el perfil complejo de las comunidades de la microbiota intestinal o ambiental, para bacterias con crecimiento lento, inusuales o difíciles, así como para las bacterias que son pobremente diferenciadas por los métodos convencionales de cultivo (Apajalahti y Kettunen, 2002⁶⁸; Hume *et al.*, 2003⁶⁹; Amit-Romach *et al.*, 2004⁷⁰). El análisis del ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Las características relevantes por los que se utiliza esta macromolécula como cronómetro molecular son:

- 1) Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales;
- 2) Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado;
- 3) Las alteraciones en su secuencia ocurren de manera muy lenta. Contiene además suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más cercanos;
- 4) El tamaño (1500 nt) del ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas;
- 5) La conservación de su estructura secundaria puede servir de ayuda en la comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso;
- 6) Se puede secuenciar el ARNr 16S por lo que existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento (Blaut *et al.*, 2002⁷¹; Rodicio y Mendoza, 2004⁷²).

El método molecular de identificación bacteriana está conformado de las siguientes etapas: a) métodos de extracción de ADN o ARN total de una muestra; b) amplificación *in vitro* de un fragmento particular del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); c) clonación del producto de PCR; 4) secuenciación y comparación de la secuencia obtenida en una base de datos.

También se puede emplear la técnica TGGE (electroforesis en gradiente de temperatura) para una estimación rápida de la diversidad y dinámica microbiana de una o varias muestras. El principio general de la TGGE es la separación por electroforesis de genes del ARNr 16S (amplificados previamente por PCR) basado en las diferencias de estabilidad de temperatura desnaturalizante de estos genes. La electroforesis se lleva a cabo en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal químico, en el caso de DGGE y un gradiente lineal de temperatura para TGGE. Con estas técnicas se logran separar fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de pares de bases. En los geles se genera un patrón de bandas que es representativo de la diversidad de la comunidad bacteriana en una muestra. Los métodos DGGE y TGGE son especialmente valiosos para monitorear cambios en la estructura de la microbiota que puedan ocurrir en respuesta a modificaciones ambientales (Muyzer *et al.*, 1993⁷⁵; McCartney, 2002⁷⁴). Es importante tener en cuenta que ninguna técnica que muestre el perfil de la comunidad bacteriana total puede al mismo tiempo ser específica para alguna especie en particular. Si ambos aspectos son necesarios debe utilizarse más de un método de determinación (Apajalahti y Kettunen, 2002⁶⁸).

2.3 Composición de la microbiota intestinal del pollo de engorda

Los pollitos recién nacidos carecen de microbiota gastrointestinal y son muy susceptibles a la colonización por bacterias entéricas patógenas. El beneficio del establecimiento temprano de microbiota normal en el pollito señalado por Nurmi y Rantala (1973⁷⁵) quienes demostraron que la inoculación oral de microbiota proveniente de aves adultas sanas protegió a los pollitos ante la colonización por *Salmonellas*, lo cual fue denominado exclusión competitiva.

El buche, íleon, ciego y colon de las aves son estructuras del tracto gastrointestinal conocidas por albergar gran cantidad de bacterias (Guan *et al.*, 2003⁷⁶). Las poblaciones de bacterias que constituyen la microbiota del buche cambian acentuadamente en los primeros 7 días de nacidos los pollos y en el período de 14 a 42 días de edad permanecen relativamente estables. Diferentes especies de lactobacilos son predominantes en esta región. La microbiota del buche se considera como un inóculo bacteriano para el intestino

(Guan *et al.*, 2003⁷⁶). Sólo un día después del nacimiento la densidad de bacterias en el íleon y ciego de los pollos alcanza valores de 10^8 y 10^{10} por gramo de digesta, respectivamente. Durante los tres primeros días después del nacimiento la cantidad de microorganismos sobrepasa a 10^{11} por gramo de contenido cecal y 10^9 por gramo de contenido ileal y permanece relativamente estable durante los siguientes 30 días (Apajalahti y Kettunen, 2002⁶⁸; Lan *et al.*, 2004⁷⁷). Maissonier *et al.* (2003⁷⁸) encontraron en su experimento que las aves que tiene una microbiota cecal limitada tienen menor longitud y peso en el aparato gastrointestinal.

Los estudios sobre la composición de la microbiota intestinal de pollo de engorda se remontan a principios del siglo XX. Investigaciones adicionales se llevaron a cabo en los años 40's por Shapiro y Sarles (1949⁷⁹), quienes estudiaron el desarrollo de la microbiota cecal desde el nacimiento del pollo y encontraron principalmente bacterias anaerobias, coliformes y ácido lácticas. No fue sino hasta los años 70's que una amplia gama de trabajos intentaron por el método de cultivo, aislar bacterias intestinales tanto como fue posible. Mead y Adams (1975⁸⁰), encontraron en sus estudios un gran número de bacterias anaerobias como componentes de la microbiota cecal capaces de descomponer ácido úrico, en pollos de 3 a 6 horas de nacidos. En los siguientes 2-4 días de edad del pollo, estreptococos y enterobacterias colonizan el intestino delgado y el ciego. Después de la primera semana, los lactobacilos predominan en el intestino delgado, y el ciego es colonizado principalmente por anaerobios (*Bacteroides* spp y eubacterium) con bajo número de aerobios facultativos *Enterobacteriaceae*, enterococci y lactobacilli. La microbiota típica en el intestino delgado de aves adultas se establece dentro de las 2 primeras semanas, sin embargo, la microbiota cecal en los adultos, compuesta en su mayoría por anaerobios obligados, tiene lugar hacia los 30 días de desarrollo. Con la edad, bifidobacterias y *bacteroides* van predominando en el ciego (Barnes *et al.*, 1972⁸¹; van der Wielen *et al.*, 2000⁶⁴).

Debido a que no todas las bacterias que constituyen la microbiota intestinal han podido ser cultivadas, se han utilizado las técnicas moleculares para caracterizar la composición de las comunidades bacterianas del tracto gastrointestinal.

Los autores Apajalahti *et al.* (2001⁸² y 2002⁸³) analizaron la microbiota del pollo con técnicas moleculares. Amplificaron el ADNr 16S por PCR usando iniciadores de todos los microorganismos conocidos. La investigación fue continuada por Apajalahti y Kettunen, (2002⁶⁸) quienes clonaron los productos de PCR y después los fragmentos representativos de ADN fueron secuenciados y analizados comparativamente. Este análisis filogenético general reveló la presencia de alrededor de 200 especies microbianas. Estos resultados parecen indicar que existen alrededor de 65 principales grupos de géneros bacterianos. En este experimento se mencionó la proporción de los géneros más abundantes presentes globalmente en el tracto gastrointestinal de pollos. El género más cuantioso fue el de *Clostridium* con 18%, *Bacteroides* 11%, *Bifidobacterium* 10%, *Faecalibacterium* 5%, *Strepto/enterococcus* 5%, y “Otros” 34%

Con el empleo de estas herramientas moleculares se ha podido dilucidar la composición de la microbiota en cada región del tracto intestinal del pollo de engorda. Van der Wielen *et al.* (2002⁸⁴) observaron el coeficiente de similitud de las comunidades bacterianas dominantes que residen en los diferentes compartimientos gastrointestinales en pollos de diferentes edades. A los 4 días de edad fueron significativamente altos los coeficientes de similitud entre el buche, el duodeno y el íleon mientras que las poblaciones bacterianas del ciego tuvieron similitudes bajas con el resto de los compartimientos. A partir de la segunda semana de edad el coeficiente de similitud se incrementó entre el íleon y el ciego. Conforme el pollo crece, la similitud de bacterias dominantes en cada región del tracto gastrointestinal llega a ser muy específica para cada compartimiento.

Amit-Romach *et al.* (2004⁷⁰) cuantificaron el ADNr de los 6 principales géneros que tienen influencia en el crecimiento y salud del intestino, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Clostridium*. Los autores indicaron que solamente la presencia de *Lactobacillus* fue consistente en todas las regiones del intestino variando ligeramente en proporción y que también se detectaron significativamente *E. coli* y *Clostridium* en duodeno y yeyuno. Diversos trabajos han descrito el desarrollo de la comunidad bacteriana en la región del íleon, los grupos bacterianos que dominaron fueron *Lactobacillus* (*L. aviarius* y *L. salivarius* predominantemente) *Streptococcus*, *Pediococcus*

y *Enterococcus* (Knarreborg *et al.*, 2002⁸⁵; Lu *et al.*, 2003⁸⁶; Bjerrum *et al.*, 2006⁸⁷; Dumonceaux *et al.*; 2006⁸⁸; Johansen *et al.*, 2006⁸⁹)

Otras investigaciones han analizado la composición de la microbiota en el ciego. En los primeros días de edad los grupos de bacterias que representan más del 90% del total de bacterias detectadas por biología molecular son: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*. Durante las primeras semanas disminuye la cantidad de estas bacterias pero continúan predominando. En la 6ª semana de edad se detectan diferentes especies de los grupos *Sporobacter*, *Clostridium sp* (principalmente *C. coccoides*, *C. Leptum*, *C. Subclase XIVa*), *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *E. coli*. Los grupos de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* se mantienen relativamente estables desde la 1ª semana y el grupo de enterobacterias disminuye con la edad. (Gong *et al.*; 2002⁹⁰; Lan *et al.*, 2002⁹¹; Zhu *et al.*, 2002⁹²; Lu *et al.*, 2003⁸⁶; Zhu y Joerger, 2003⁹³; Amit-Romach *et al.*, 2004⁷⁰; Bjerrum *et al.*, 2006⁸⁷; Gong *et al.*, 2007⁹⁰).

2.4 Manipulación de la microbiota intestinal

La composición de la dieta es un factor importante por el cual la microbiota intestinal puede ser modificada debido a que tiene influencia sobre el sustrato disponible para las poblaciones bacterianas. La bacteria que puede más rápidamente degradar y usar este sustrato proliferará más que las otras (Strickling *et al.*, 2000⁴⁷). Dietas de carbohidratos, proteínas, aminoácidos y lípidos no digeribles son importantes sustratos para bacterias intestinales (Collins y Gibson, 1999²¹; Mackie *et al.*, 1999⁵⁹; Zentek *et al.*, 2003⁹⁴). Métodos más directos como los antibióticos, prebióticos, probióticos u otros aditivos en el alimento también influyen sobre la composición de la microbiota intestinal (Knarreborg *et al.*, 2002⁸⁵; Lan *et al.*, 2004⁷⁷; Smirnov *et al.*, 2005⁶⁶).

Se han llevado a cabo diferentes estudios para evaluar el efecto de los prebióticos sobre la composición de la microbiota intestinal del pollo. En el experimento realizado por Guo *et al.* (2004⁹) fue evaluado el efecto de prebióticos a base de extractos de hongos sobre la ecología cecal. Los investigadores observaron los conteos significativamente más altos de anaerobios totales, bifidobacterias y lactobacilos y los más bajos de *Bacteroides spp.* y *E. coli* en el grupo de aves suplementado con estos prebióticos. En otro trabajo se adicionó

fructooligosacáridos al 0.4% en el alimento de pollos y se demostró que los conteos de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* incrementaron, así mismo se inhibió el crecimiento de *E. coli* en el contenido del intestino delgado y del ciego (Xu *et al.*, 2003⁹⁵). Los isomalto-oligosacáridos aumentaron la biomasa en el contenido del ciego del género *Bifidobacterium* y se redujeron los conteos de *Salmonella*. Sin embargo este prebiótico no tuvo influencia sobre el conteo total de aerobios, de *Lactobacillus* y *E. coli* (Zhang *et al.*, 2003⁹⁶; Chung y Day, 2004⁹⁷). El efecto del manano oligosacárido sobre la microbiota cecal se evaluó en pavos suplementados con Bio-Mos® (0.1%), en los que se observó un incremento significativo en la cantidad de *Bifidobacterium* y el total de anaerobios mientras que disminuyó la concentración de *Clostridium perfringes* (Sims *et al.*, 2004⁴³).

El campo de estudio sobre la composición de la microbiota intestinal además de establecer la identificación de nuevas poblaciones bacterianas y su relación filogenética, se pretende conocer la actividad de cada tipo de bacteria y cómo estas interactúan entre ellas en la ecología intestinal, cómo puede ser favorecido o disminuido su desarrollo para establecer un equilibrio de la microbiota. También explicar los posibles mecanismos por los cuáles esta microbiota intestinal le proporciona a su hospedero salud y bienestar. En la medida que se vayan esclareciendo estos puntos se buscara manipular la microbiota intestinal a través de aditivos como el MO para mantener la salud y mejorar el rendimiento de los animales en producción.

JUSTIFICACIÓN

Una de las principales rutas por la cual se transmiten bacterias resistentes a antibióticos, es por la cadena alimenticia en la cual se incluye a los alimentos y a los manipuladores de éstos. La carne de pollo es una de las fuentes más importantes de proteína de origen animal para varias poblaciones del mundo, sin embargo ésta también se ha identificado como un vehículo transmisor de patógenos resistentes a los antimicrobianos. El hecho de prescindir de los antibióticos promotores del crecimiento en las dietas para aves, puede influir en la salud intestinal de estos animales en términos de la frecuencia en la que se presenten infecciones asociadas con microorganismos potencialmente patógenos. Lo anterior en conjunto con la demanda de los consumidores por alimentos con altos estándares de calidad y que además le proporcionen beneficios a su salud, obliga a la industria avícola a buscar alternativas que sean seguras y efectivas para mantener una buena producción y calidad de las aves. Una de estas alternativas, moduladoras de la microbiota intestinal, es el prebiótico MO que ha mostrado eficacia en la remoción de bacterias patógenas. Sin embargo, en diferentes experimentos donde se ha evaluado el impacto del aditivo MO sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda y pavos, los resultados han sido poco consistentes. Lo anterior entre otros aspectos por las condiciones experimentales, dosis y manufactura del producto empleado.

Con el siguiente trabajo de investigación se proporcionará información relacionada con las características, modo de acción y efecto del MOS sobre la microbiota del pollo de engorda, así como en relación al efecto del producto en el desarrollo de las aves.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un manano oligosacárido a la dosis del 0.1% sobre la composición de la microbiota ileal y cecal así como en el comportamiento productivo del pollo de engorda, para proponer su uso como alternativa al empleo de el antibiótico promotor de crecimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la composición de la microbiota en íleon y ciego de pollos de engorda suplementados con el prebiótico manano oligosacárido.
- Analizar el tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos suplementados con el prebiótico manano oligosacárido.
- Evaluar el efecto de un manano oligosacárido sobre el peso corporal, la ganancia diaria de peso, consumo de alimento, y el índice de conversión alimenticia en pollos de engorda.
- Evaluar el rendimiento en canal y la pigmentación en piel de pollos suplementados con el prebiótico manano oligosacárido, como indicadores de calidad de la carne.

HIPÓTESIS

La suplementación con un manano oligosacárido modifica la composición de la microbiota intestinal y beneficia el comportamiento productivo del pollo de engorda.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM ubicado en Delegación Tlahuac, México, D. F.

El CEIEPAv se encuentra a una altitud de 2 250 msnm, tiene una superficie total de 48 470 m² con una temperatura media anual de 18°C y una precipitación pluvial de 747 mm.

Animales y dietas

Se utilizaron 486 pollitos de 1 día de edad de la estirpe Ross X Ross de ambos sexos que fueron asignados aleatoriamente a 3 tratamientos con 6 réplicas de 27 pollos cada una. Las aves fueron criadas en piso con cama de viruta. La temperatura se mantuvo a 30-32°C en la 1ª semana y fue disminuyendo 3-4°C por semana hasta mantenerla en 24°C en el periodo de finalización. Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* durante las 7 semanas de experimentación.

Las dietas se formularon en dos etapas: 1) iniciación (1-20 días de edad) y finalización (21-49 días de edad), balanceadas conforme a las recomendaciones del NRC (1994⁹⁸), para cubrir los requerimientos nutricionales del pollo de engorda (Cuadro 1).

Las dietas basales estuvieron formuladas con base a pasta de soya y sorgo, sin antibiótico y con nicarbacina (0.05%) como coccidiostato, esta dieta se asignó para el tratamiento Control Negativo.

El tratamiento Control Positivo fue la dieta basal más la adición de bacitracina (0.03%) como APC.

El tercer tratamiento se denominó como MOS, en éste a la dieta basal se le adicionó el prebiótico Bio-Mos® (Alltech Inc., Nicholasville, KY) al 0.1% de inclusión. Este producto es obtenido de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En el periodo de finalización a la dieta basal se incluyó el pigmento Avelut® al 0.54% y fue sustituido el coccidiostato nicarbacina por monensina al (0.05%).

Parámetros Productivos

Para determinar el consumo de alimento, la ganancia de peso, y el peso corporal de las aves se obtuvieron datos a los 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 48 días de edad por réplica en cada uno de los tratamientos. Los animales y el alimento fueron pesados en una balanza digital y las observaciones fueron registradas en gramos. El consumo de alimento se ajustó a la mortalidad. El índice de conversión alimenticia se calculó como la razón entre el alimento consumido y la ganancia de peso.

Los parámetros productivos fueron determinados también en los intervalos de 0-3 semanas y de 0-7 semanas de edad.

Identificación de la Microbiota Intestinal

Para conocer la composición de la microbiota en el contenido ileal y cecal fueron utilizadas la reacción de PCR y la técnica molecular Electroforesis en Gradiente de Temperatura (TGGE). Una vez obtenido el patrón de bandas en el gel TGGE fueron identificadas las bacterias con el análisis de secuenciación.

COLECCIÓN DE MUESTRA. Para la colección de muestra del contenido ileal y cecal se utilizaron dos pollos por réplica a los días 7, 14, 21 y 45 días de edad en cada uno de los tratamientos. El contenido intestinal de dos aves fue colectado en un mismo tubo para obtener un total de tres réplicas por tratamiento.

Los pollos fueron sacrificados por dislocación cervical y el tracto gastrointestinal fue removido de la cavidad abdominal cuidadosamente. Dos regiones de intestino fueron seccionadas, la porción distal del ileon (15 cms anterior a la unión ileocecal) y los ciegos completos. El contenido ileal y cecal fue colectado asépticamente en tubos estériles, los cuales se mantuvieron a 4°C durante la colección. Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Instituto de Ingeniería de la UNAM, en donde fueron conservadas a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN.

EXTRACCIÓN DE ADN. Se utilizó el kit Ultra Clean Fecal DNA de Mo-Bio® (Laboratories Inc, Solana Beach, Calif).

Protocolo: 1) En una columna pesar de 250-350 mg de muestra; 2)añadir 550 µl de solución Fecal Bead y mezclar las muestras; 3) agitar solución S1; 4) adicionar 60 µl de S1 y mezclar; 5) agregar 200 µl de solución IRS; 6) agitar (mecánica con vortex) a máxima velocidad por 10 min; 7) centrifugar a 10, 000 x g durante 2 min; 8) obtener el sobrenadante y vaciarlo a un tubo limpio; 9) adicionar 250 µl de solución S2 al súper nadante; 10) agitar con vortex durante 5 seg. 11) Incubar a 4°C/5 min; 12) Centrifugar a 10, 000 x g durante 1 min; 13) obtener el sobrenadante y vaciarlo a un tubo limpio; 13) adicionar 900 µl de solución S3 al sobre nadante y agitar con vortex 5 seg; 14) colocar 700 µl de la muestra dentro de una columna filtro y centrifugar a 10 000 x g por 1 min. Desechar el precipitado. Realizar este mismo paso hasta terminar con el total de la muestra; 15) adicionar 300 µl de solución S4 y centrifugar a 10 000 x g durante 30 seg; 16) Desechar el líquido restante; 17) centrifugar por 1 min; 18) colocar el filtro en otro tubo; 19) adicionar 50 µl de solución S5 al centro del filtro o ddH₂O; 20) centrifugar por 30 seg; 21) descargar el filtro. El ADN queda precipitado y purificado.

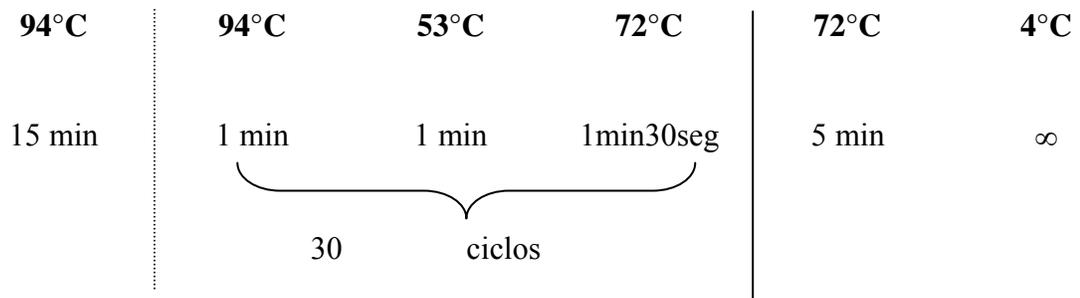
De cada una de las tres réplicas por tratamiento fueron tomados 20µl del ADN purificado y depositados en un tubo limpio para formar una muestra compuesta por edad y por cada región del intestino.

AMPLIFICACIÓN POR PCR. Se llevo a cabo una prueba piloto para determinar la concentración óptima de ADN y las condiciones para la reacción de PCR. Se realizó primero la cuantificación de ADN en cada muestra en un gel de Agarosa al 0.8%. El gel fue analizado con el equipo Gel Doc Bio-Rad® y fue calculado que en 2 µl de muestra de ADN purificado hay 200 ng de ADN.

La region variable V3 de 16S rADN fue enzimáticamente amplificada en la PCR con iniciadores de regiones conservadas de genes del ARNr 16S. Las secuencias de nucleótidos de los iniciadores fueron: P518, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'; P341-GC, 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGA GGCAGCAG-3', este iniciador tiene en la posición 5' 40-nucleótidos con una secuencia

rica en bases **GC** (conocida como GC “grapa”). Se utilizaron la combinación de P518 y P341-GC para amplificar las regiones del ADNr 16S en diferentes especies bacterianas las cuales corresponden a las posiciones 341 a 534 en *E. coli* (Muyzer *et al.*, 1993⁷³).

La reacción de Amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50µl: 5µl de Tampón para enzima 10X; 3µl de Mg; 10 µl de Sol Q; 0.5µl de nucleótidos; 1µl de iniciador P341-GC; 1µl de iniciador P534; 2 µl ADN para muestra de intestino y 1 µl de ADN de *Salmonella enteritidis* como control; 0.3µl de Enzima Hot Star Taq Polimerasa; El volumen total fue ajustado a 50 µl con ddH₂O. Esta reacción se llevó a cabo en un Termociclador de Gradiente Eppendorf® bajo el siguiente programa:



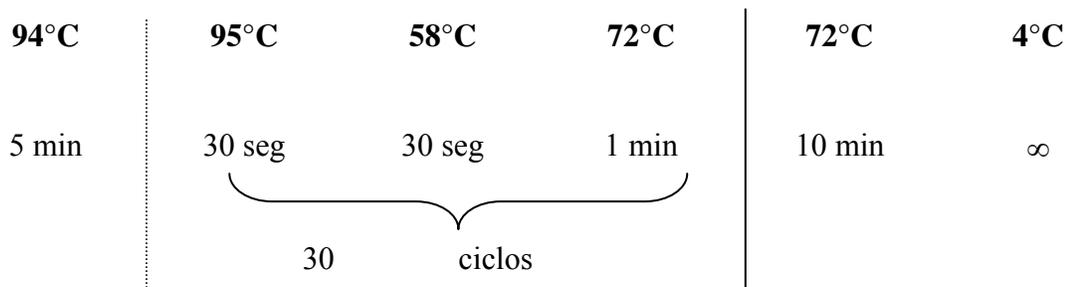
La presencia de los productos de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de Agarosa al 2%.

Para obtener mayor concentración de ADN en cada muestra a estos productos de PCR se les realizó nuevamente una PCR bajo las mismas condiciones de reacción y el mismo programa en el termociclador. La presencia de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de Agarosa al 2%.

ELECTROFORESIS EN GRADIENTE DE TEMPERATURA. La TGGE se realizó en un DCode Universal Mutation Detection Sistem (Bio-Rad, Hercules, Calif.). Se utilizaron geles de poliacrilamida-bisacrilamida de 16 cm por 16 cm por 1mm de grosor. Los geles fueron hechos al 8% con los siguientes reactivos: 8ml 40% archilamida/bis; 1ml tampón TAE 50X; 16.8g Urea para 7M; 30 µl de TEMED; 400 µl de persulfato de amonio 10%; aforar a un volumen total de 40 ml con ddH₂O. La electroforesis fue establecida con un voltaje

constante de 130V durante 5hr y 30min. En el sistema Dcode Universal la temperatura fue programada para que incrementara la tasa de temperatura 2°C cada hora. El gradiente de temperatura inició con 56.9°C y terminó en 68°C. Para analizar el perfil de comunidades bacterianas se utilizó un gel para cada una de las regiones de intestino (íleon y ciego). Al término del proceso de electroforesis los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio y se analizaron en un transiluminador de rayos UV con el software Quantity-One (Bio-Rad, Hércules, Calif).

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS POR SECUENCIACION DE BANDAS OBTENIDAS POR PCR-TGGE. Del patrón de bandas obtenido por TGGE fueron seleccionadas las bandas de mayor interés para el trabajo (por su posición y/o intensidad). Estas bandas se cortaron asépticamente y fueron colocadas en tubos limpios. A cada banda se le adicionaron 200µl de ddH₂O y se mantuvieron a temperatura ambiente por 24hrs para permitir la elusión del ADN. Posteriormente se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando los mismos iniciadores pero sin la grapa GC. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador Eppendorf[®] bajo el siguiente programa:



La presencia de los productos de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de Agarosa al 2%.

El producto resultado de la PCR fue purificado con el Kit Purificación de PCR QIAquick (Qiagen). Finalmente se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 2% para analizar el ADN limpio de los reactivos de PCR.

El Análisis de secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos Gen-Bank para lo cual fue empleado el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment & Search Tool). El BLAST es un

programa que compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias de bases de datos y calcula la significancia estadística de esta comparación.

Análisis del Tiempo de Tránsito Gastrointestinal (TTG)

Se realizaron 3 evaluaciones del TTG a los 12, 24 y 36 días de edad del pollo. Se utilizaron dos aves por réplica en cada tratamiento, los mismos pollos cada semana para reducir la variación individual. El óxido férrico fue utilizado como marcador a una dosis de 200mg/kg peso para determinar el TTG (Washburn, 1991⁹⁹).

El consumo de alimento se restringió durante 2 horas a los pollos seleccionados para la prueba y se colocaron aleatoriamente en jaulas individuales con piso de malla que fue cubierto con papel blanco, cada jaula tenía recipiente para agua y alimento. Posterior al tiempo de ayuno el marcador fue administrado en una cápsula de gelatina que fue colocada en la orofaringe del ave para su deglución espontánea. Las cápsulas se dieron al mismo tiempo a los 2 pollos de cada réplica, los pollos tuvieron acceso libre al agua y a su dieta tratamiento correspondiente durante el tiempo de la prueba. Se revisaron las excretas cada 10 minutos en las primeras dos horas pos administración de la cápsula y después más frecuentemente hasta encontrar el tinte rojo del marcador en las heces. El tiempo en que el marcador se administró y el tiempo en el cual apareció la tonalidad roja en la excreta fue registrado para cada pollo (unidad experimental). El TTG fue calculado como la diferencia entre estos dos tiempos de registro en minutos.

Evaluación del Rendimiento en Canal

Se registró el peso (g) de 30 pollos seleccionados aleatoriamente por tratamiento a los 49 días de edad y se designó como peso vivo.

Se llevó a cabo el proceso de sacrificio de estos animales bajo condiciones comerciales. Posteriormente se registró el peso de la canal eviscerada (g).

El rendimiento en canal fue la relación centesimal del peso de la canal con el peso vivo del ave. Así mismo, fue evaluado el rendimiento de la pechuga y de la pierna con muslo al pesar la carne (con hueso) en una balanza digital. Este peso se expresó como porcentaje en relación al peso de la canal eviscerada.

Evaluación del Grado de Pigmentación

Los valores de luminosidad (L), amarillamiento (b*) y enrojecimiento (a*) se midieron con el colorímetro de reflectancia Minolta® (Modelo CR-400) con el sistema CIELab. La lecturas se realizaron en la zona conocida como la “vena de la grasa” (apterilo lateral) en los 30 pollos (49 días de edad) seleccionados para el procesamiento comercial. La evaluación de la pigmentación en piel se hizo en los pollos vivos y en las canales después del desplume (pollo caliente). La calibración del colorímetro Minolta fue hecha con la placa blanca (de cerámica) de referencia incluida en el aparato.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con un software comercial de SAS®¹⁰⁰. El Modelo estadístico fue un Diseño Completamente Aleatorizado para la evaluación de parámetros productivos, la determinación del grado de pigmentación y la determinación del rendimiento en canal. Se utilizó un modelo de Parcelas Divididas para la determinación del TTG. Los datos fueron analizados por Análisis de la Varianza con el procedimiento de Modelos Lineales Generales. Las diferencias entre grupos fueron determinadas por comparaciones múltiples de Tukey con una significancia predeterminada de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Parámetros Productivos

PESO CORPORAL Y GANANCIA DE PESO. Durante las 7 semanas de experimentación el peso corporal y la ganancia de peso no fueron afectadas por los tratamientos (Cuadro 2). El grupo alimentado con dieta control fue el de menor peso y menor ganancia, sin embargo no hubo diferencia significativa entre dietas.

CONSUMO DE ALIMENTO E ÍNDICE DE CONVERSIÓN ALIMENTICIA. No se observó efecto significativo de los tratamientos control negativo, control positivo y el Bio-Mos sobre el consumo de alimento y el índice de conversión en ambos periodos de 0-3 y de 0-7 semanas (Cuadro 3).

Identificación de la Microbiota Ileal y Cecal

Se realizó la técnica TGGE y el Análisis de secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos por cada región de intestino. Existió poca diferencia en el número de bandas dominantes visibles en las muestras de los pollos de diferentes edades y dietas. De un total de 19 bandas del gel TGGE se obtuvieron resultados en el análisis BLAST con la base de datos Gen-Bank. Algunos resultados de estas bandas no se presentan debido a que fueron altamente inespecíficos en la base datos empleada.

PERFIL DEL TGGE Y SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL CONTENIDO DEL ILEON. La comparación de bandas del contenido ileal (imagen del gel TGGE) de las principales bandas visibles sobre el gel que contiene las muestras de los 3 grupos tratamiento (Control negativo, Control positivo y MOS) en aves de 4 diferentes edades (7, 14, 21 y 45) analizado con el software Quantity-One (Bio-Rad) (Figura 3).

En el tratamiento Control negativo en las aves de 21 días de edad estuvo presente el fragmento *a*. El análisis de secuenciación de este fragmento de ADN mostró un 94% de similitud con *Clostridium sp.* La banda *b* fue identificada en el análisis BLAST (100%

similitud) con la bacteria *Ruminococcus gauvreaui* también a la edad de 21 días. El fragmento *e* (90% de similitud) corresponde a una bacteria todavía no cultivada (con número de acceso DQ801263.1 en Gen-Bank) se refiere a una bacteria de intestino humano asociada con obesidad y fue localizada a los 7, 21 y 45 días de edad en este grupo de aves; la banda *f* (94%) corresponde a *Rumen bacterium* (no cultivado) fue detectada en los pollos de primer semana de edad y en el día 45; la banda *i* representa con un 92% de similitud en el análisis BLAST a una bacteria todavía no cultivada (DQ416137.1 en Gen-Bank). Esta banda se encontró en todas las edades y se refiere a una bacteria perteneciente al subgrupo de *Clostridium leptum*.

En la dieta Control positivo estuvieron presentes los fragmentos *a* y *b* únicamente en las aves de segunda semana de edad. La banda *e* (que refiere a una bacteria de intestino humano asociada con obesidad) fue detectada en los pollos de 21 y 45 días de edad; el fragmento de ADN *f* (*Rumen bacterium*) fue localizado en las aves de 45 días de edad pertenecientes a este tratamiento; la banda *i* se refiere a una bacteria que pertenece al subgrupo *Clostridium leptum* estuvo presente a partir del día 14 de edad en adelante y en el carril que corresponde a *Salmonella enteritidis*.

En el tratamiento MOS en los pollos de 7 días de edad estuvieron presentes las bandas *a* y *b* (*Clostridium sp* y *Ruminococcus gauvreaui*, respectivamente). Durante todo el periodo de crecimiento observado se detectaron los fragmentos de ADN *e* (bacteria asociada con obesidad) y el *i* (bacteria que pertenece al subgrupo *Clostridium leptum*). En las aves pertenecientes a este grupo no fue encontrada la banda *f* (*Rumen bacterium*).

PERFIL DEL TGGE Y SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL CONTENIDO DEL CIEGO. La comparación de bandas del contenido cecal (imagen del gel TGGE) de las principales bandas visibles sobre el gel que contiene las muestras de los 3 grupos tratamiento (Control negativo, Control positivo y Bio-Mos®) en aves de 4 diferentes edades (7, 14, 21 y 45) fue analizado con el software Quantity-One (Bio-Rad) (Figura 4).

En la dieta Control negativo fue detectado el fragmento de ADN *a* que fue identificado en el análisis BLAST como *Clostridium sp*. (95% similitud) en los pollos de 14, 21 y 45 días de edad; el *Ruminococcus gauvreaui* (100% similitud), banda *b*, se presentó en las aves de

45 días; el fragmento *c* (89%) representa a una bacteria perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* apareció en todas las edades en este tratamiento; la banda *d* fue identificada como *Ruminococcus sp.* (94% similitud) únicamente fue localizada en este tratamiento en las aves de 21 días de edad; el análisis de secuenciación de la banda *e* mostró un 90% de similitud con una bacteria no cultivada hasta el momento (con número de acceso en el Gen-Bank DQ801263.1) se refiere a una bacteria de intestino humano asociada con obesidad. Esta banda fue detectada a los 21 y 45 días de edad en este grupo de aves. *Rumen bacterium* (98% similitud), banda *f*, fue detectada durante todo el período de crecimiento observado; el fragmento *g* corresponde a alguna de las bacterias aún no cultivadas que se han encontrado por biología molecular en el ciego de pollos de engorda. El análisis BLAST mostró un 96% de similitud con estas bacterias con número de acceso en el Gen-BanK: DQ342337.1; AF376204.1; ABO75623.1 y fue encontrado únicamente a los 14 días de edad; la banda *h* corresponde a una bacteria no cultivada todavía (localizada en intestino humano) con un porcentaje de similitud de 96 en el análisis BLAST (con número de acceso en el Gen-Bank EF604703.1) estuvo presente solamente en aves de primera semana de edad; el fragmento de ADN *i* (92% de similitud) correspondió a la bacteria aún no cultivada con número de acceso en Gen-Bank DQ416137.1 (pertenece al subgrupo *Cl. leptum*) y fue encontrada durante las tres primeras semanas de vida en los pollos de este tratamiento

En el tratamiento Control positivo el *Clostridium sp.* (banda *a*) fue detectado durante todo el periodo de crecimiento evaluado; la banda *b* correspondió a *Ruminococcus gauvreaui* y estuvo ausente en este tratamiento; el fragmento de ADN denominado *c* representa a una bacteria perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* y fue localizado principalmente en los pollos de primera, segunda y tercer semana de edad; la banda *d* no apareció en este grupo de aves; el análisis de secuenciación de la banda *e* mostró un 90% de similitud con una bacteria no cultivada hasta el momento (DQ801263.1) se refiere a una bacteria de intestino humano asociada con obesidad. Esta banda fue detectada en los pollos pertenecientes a este tratamiento a los 14 y 21 días de edad; *Rumen bacterium* (banda *f*) fue detectada en todas las edades; el fragmento *g* corresponde a alguna de las bacterias aún no cultivadas que se han encontrado por biología molecular en el ciego de pollos de engorda (DQ342337.1;

AF376204.1; ABO75623.1 en Gen-BanK) y fue localizado únicamente a los 21 días de edad. La banda **h** corresponde a una bacteria localizada en intestino humano (con número de acceso en el Gen-Bank EF604703.1) estuvo presente solamente en aves de primera y tercer semana de edad; el análisis de secuenciación de la banda **i** mostró un 92% de similitud con una bacteria que pertenece al subgrupo *Clostridium leptum* (DQ416137.1 en Gen-Bank) y apareció en los pollos de 7 y 14 días de edad.

En la dieta MOS el fragmento de ADN **a**, *Clostridium sp.*, fue detectado a los 7, 14, y 45 días de edad del pollo; la banda **b** correspondió a *Ruminococcus gauvreaui* y se presentó en las aves de 14 y 21 días de edad; el fragmento **c** representa a una bacteria perteneciente a la familia *Lachnospiraceae* y fue localizado en las edades de 7, 14 y 45 días; el *Ruminococcus sp.* (banda **d**) no estuvo presente en este tratamiento; la banda asignada como **e** fue detectada solamente hacia el final del periodo de engorda (45 días), el análisis de secuenciación indicó que es una bacteria no cultivada hasta el momento (DQ801263.1 en Gen-Bank) se refiere a una bacteria de intestino humano asociada con obesidad. *Rumen bacterium* (banda **f**) fue detectada durante todo el período de crecimiento observado; el fragmento **g** corresponde a alguna de las bacterias aún no cultivadas que se han encontrado por biología molecular en el ciego de pollos de engorda (DQ342337.1; AF376204.1; ABO75623.1 en Gen-Bank) y fue localizado en aves de 7 y 14 días de edad en las aves pertenecientes a esta dieta; la banda **h** corresponde a una bacteria no cultivada (con número de acceso en el Gen-Bank EF604703.1) estuvo presente en la primer semana de edad de los pollos y ha sido detectada en intestino humano; del subgrupo *Cl leptum* (DQ416137.1 en Gen-Bank) la banda **i**, apareció en los pollos de 7 y 14 días de edad.

Análisis del Tiempo de Tránsito Gastrointestinal

El TTG no fue afectado por las dietas de las aves de 12, 24 y 36 días de edad con una media de 175 min. No hubo interacción entre la edad y el tratamiento ($P= 0.12$). Hubo efecto significativo ($P<0.05$) de la edad sobre el TTG observándose un incremento conforme la edad avanzó.

Evaluación del Rendimiento en Canal

Los resultados del rendimiento en canal (Cuadro 4) no mostraron diferencia significativa de los tratamientos en cuanto al rendimiento en canal. Tampoco hubo efecto de los tratamientos sobre el rendimiento de la pechuga y el rendimiento de la pierna con muslo ($P>0.05$).

Evaluación del Grado de Pigmentación

Hubo evidencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) que el tratamiento MOS mejoró el grado de amarillamiento (\mathbf{b}^*) 43.36 en relación al tratamiento control positivo 41.21 en pollo caliente (después del desplume). Las mediciones que también se realizaron en pollo caliente indicaron que el grado de enrojecimiento (\mathbf{a}) del grupo MOS fue de 1.28 y para el control negativo y el control positivo, 2.11 y 2.47, respectivamente ($P=0.071$). No se encontró evidencia estadísticamente significativa para inferir que alguno de los tratamientos control o el MOS fuera diferente en cuanto a los grados de pigmentación \mathbf{a}^* y \mathbf{b}^* en el pollo de engorda vivo (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

Parámetros Productivos

El experimento fue diseñado para evaluar el efecto de un MOS sobre el comportamiento productivo del pollo de engorda. Los resultados aquí presentados demostraron que no hubo influencia de los tratamientos sobre el peso corporal (PC) y la ganancia de peso (GP). Estos resultados van de acuerdo con los de otras investigaciones (Iji *et al.* 2001⁴⁹, Waldroup *et al.*, 2003¹⁰¹, Sun *et al.*, 2005⁵², Baurhoo *et al.*, 2007⁵³). En otros resultados se concluyó que las aves suplementadas con 0.3% de la pared celular de *S. cerevisiae*, lograron las mejores GP en un periodo de evaluación de 5 semanas (Zhang *et al.*, 2005⁵⁰).

No se observaron diferencias entre dietas en el consumo de alimento (CA) e índice de conversión alimenticia (ICA). En cambio, otros estudios encontraron que el ICA de pollos de engorda fue significativamente mejorado por el aditivo MOS (Waldroup *et al.*, 2003¹⁰¹; Zhang *et al.*, 2005⁵⁰). Se ha observado un efecto sinérgico entre el MOS y los probióticos. Los autores Sun *et al.*, 2005⁵² emplearon un programa de alimentación en pollos de engorda como sigue: administraron un probiótico (*Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pedococcus*) al nacimiento y posteriormente estas aves fueron suplementadas con MOS en el alimento. Con este programa de alimentación el ICA acumulado a 49 días fue mejorado significativamente.

En un estudio retrospectivo (1997-2003) intitulado “Holo-análisis de la eficacia del Bio-Mos[®] en la nutrición del pollo de engorda” el autor concluyó que para obtener respuestas positivas de este aditivo sobre la GP se necesitaría emplear una dosis de Bio-Mos[®] por encima de 1.88 g/kg alimento y para mejorar el ICA se requeriría a una inclusión por arriba de 2.17 g Bio-Mos/kg alimento (Rosen, 2007¹⁰²). El nivel de inclusión del Bio-Mos[®] en la dieta tratamiento asignado fue adicionado a 1kg/ton (0.1%). Probablemente por esta razón no se obtuvo una respuesta positiva sobre los parámetros productivos. Por otro lado, ha sido reportado que los antibióticos promotores del crecimiento y la mayoría de los aditivos moduladores de la microbiota gastrointestinal, son más efectivos cuando existen condiciones de estrés y enfermedad, tales como temperaturas ambientales extremas, sobrepoblación, manejo ineficiente (Sims *et al.*, 2004⁴³). El presente trabajo fue realizado

bajo condiciones higiénicas (baja densidad de población, cama limpia, manejo apropiado de temperaturas y ventilación) lo cual indicó que existió un mínimo desafío bacteriano. De esta manera pudiera explicarse que las aves no necesitaron de ningún aditivo para lograr niveles de crecimiento adecuados.

Los mecanismos de acción del MOS por los cuales el comportamiento productivo del pollo puede ser beneficiado son la adsorción de bacterias que expresan lectinas Fimbria tipo 1 como lo son *E. coli* y *Salmonella* en el tracto gastrointestinal (Oyofu *et al.*, 1989^{39,40}; Spring *et al.*, 2000¹⁴; Fairchild *et al.*, 2001²; Zdunczy *et al.*, 2005¹³); mejorando la función e integridad intestinal (Iji *et al.*, 2001⁴⁹; Sun *et al.*, 2005⁵²; Zhang *et al.*, 2005⁵⁰; Baurhoo *et al.*; 2007⁵³) y la modulación del sistema inmune (Swanson *et al.*, 2002⁴⁸; Shashidhara y Devegowda, 2003¹²).

Debemos considerar que en los pollitos, cuando ocurre la transferencia del contenido del Saco Vitelino o el alimento toma lugar en el tubo digestivo, se inicia un rápido desarrollo de la estructura y función del intestino delgado. Durante la primer semana de vida este órgano crece a una velocidad superior a la del peso corporal (Iji *et al.*, 2001¹⁰³, Sklan y Noy, 2003¹⁰⁴) y es la etapa más susceptible en la que el pollito puede ser infectado por bacterias patógenas. La presencia del alimento en el intestino es un estímulo substancial para el crecimiento de la mucosa en aves y mamíferos. Ha sido demostrado que la masa del intestino incrementa cerca del 600% dentro de los primeros 7 días del nacimiento del pollo alimentado y que el volumen de vellosidades y profundo de criptas intestinales se eleva enormemente de los 4 a los 21 días de edad (Batal y Parsons, 2002¹⁰⁵). Aditivos como el prebiótico MOS en el alimento puede favorecer el desarrollo y la salud del tracto gastrointestinal en los pollos.

Identificación de la Microbiota Ileal y Cecal

Se evaluó el efecto del aditivo MOS sobre la composición de la microbiota intestinal en dos regiones del tracto gastrointestinal (íleon y ciego) del pollo de engorda para lo cual se utilizó la técnica molecular Electroforesis en Gradiente de Temperatura (TGGE) con los productos del ADNr 16S amplificados. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el contenido ileal y cecal de pollos de diferentes edades con los tratamientos

control negativo (CN), control positivo (CP) y MOS, albergan relativamente un bajo número de comunidades bacterianas predominantes entre las cuales las familias *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* y el *Ruminococcus gauvreaui* fueron comúnmente detectadas.

En el ciego hubo mayor diversidad de comunidades bacterianas que en el íleon (Figura 3 y 4) por el hecho de mostrar un mayor número de bandas visibles en el gel TGGE. Estos resultados van de acuerdo con los de otros investigadores que han estudiado el desarrollo de la microbiota en el íleon y el ciego (Bjerrum *et al.*, 2006⁸⁷; Johansen *et al.*, 2006⁸⁹; Gong *et al.*, 2007¹⁰⁶). La diferencia en composición y concentración de nutrientes, pH intraluminal, disponibilidad de oxígeno, y temperatura entre estas regiones del intestino pudieran contribuir a este efecto (Simpson *et al.*, 2000¹⁰⁷; Johansen *et al.*, 2006⁸⁹).

En las imágenes de los geles TGGE (Figura 3 y 4) hubo mínima diferencia en el número de bandas visibles en las muestras de íleon y ciego en las diferentes edades (7, 14, 21 y 45 días). En el íleon el *Clostridium sp* y las bacterias no cultivadas con número de acceso en Gen-Bank DQ416137.1 (perteneció al grupo *Clostridium leptum*) y DQ801263.1 (bacteria asociada con obesidad en humanos) fueron localizadas durante todo el período de crecimiento observado en las aves. En el ciego fue detectado *Rumen bacterium* y *Clostridium sp.* en todas las edades observadas. El *Ruminococcus gauvreaui* e integrantes de la familia *Lachnospiraceae* estuvieron presentes a partir de la segunda semana de edad del pollo de engorda. Algunos autores han demostrado que la complejidad del patrón de bandas generado en geles (DGGE y TGGE) se incrementa conforme aumenta la edad de las aves (Knarreborg *et al.*, 2002⁸⁵; van der Wielen *et al.*, 2002⁸⁴; Hume *et al.*, 2003⁶⁹; Johansen *et al.*, 2006⁸⁹). Lü *et al.* (2003⁸⁶) indicó que la estructura de las comunidades bacterianas son relativamente estables durante el período del crecimiento esquelético acelerado (14-28 días) y después se observa sin cambios significativos durante el período de mayor ganancia de peso y hacia el final del período de la engorda (49 días).

Por lo que se refiere a la edad y el tratamiento, en el contenido del íleon las bacterias *Clostridium sp.* y el *Ruminococcus gauvreaui* aparecen en las aves del tratamiento CP y el CN, en la segunda y tercera semana de edad, respectivamente, mientras que en el MOS en las aves de 7 días; una bacteria de la familia *Lachnospiraceae*, la bacteria número

DQ801263.1 en Gen-Bank (bacteria asociada con obesidad) fueron detectadas en los tratamientos CN y CP a los 21 y 45 días de edad. La bacteria *Rumen bacterium* solamente fue detectada en los tratamiento control no así en el MOS. En cambio la bacteria que pertenece al subgrupo *Clostridium leptum* (DQ416137.1 en Gen-Bank) fue común a todos los tratamientos y edades.

En el contenido cecal destacan las bacterias *Ruminococcus sp.* que estuvo presente solamente en el tratamiento CN; el *Ruminococcus gauvreaui* el cual fue localizado en el CP, en aves de 45 días de edad y en el MOS a las edades de 14 y 21; el *Rumen bacterium* fue común a todos los tratamientos y edades. La bacteria localizada en intestino humano asociada con obesidad (DQ801263.1 en Gen Bank) estuvo presente en los grupos CP a los 14 y 21 días de edad y en el CN a la edad de 21 y 45. Las bacterias identificadas en ciego de pollo en Gen-Bank se encontraron en el CN a los 14 días, a los 21 en el CP y en aves de 7 y 14 días de edad en el tratamiento MOS.

Los resultados anteriores indicaron un efecto de la composición de la dieta sobre el desarrollo de las comunidades bacterianas dominantes en el íleon y el ciego. Diferentes investigaciones se han llevado a cabo para evaluar cómo la composición de la dieta tiene influencia sobre la estructura de la microbiota intestinal, tipo de ingredientes y manufactura (Apajalahti *et al.*, 2001⁸²), administración de aditivos como los APC (Knarreborg *et al.*; 2002⁸⁵; Dumonceux *et al.*, 2006⁸⁸), los probióticos (Lan *et al.*, 2004⁷⁷; Netherwood *et al.*, 1999¹⁰⁸) y prebióticos.

Estudios basados en método de cultivo han caracterizado el tipo de bacterias presentes en el contenido del ciego en pavos suplementados con Bio-Mos. Zdunczyk *et al.*, (2005¹³) advirtió una correlación negativa ($r=-0.551$, $P<0.01$) entre los conteos de *E. coli* y el contenido de Bio-Mos[®] en la dieta. En otro trabajo, pavos suplementados con Bio-Mos[®] (0.1%) se incrementó significativamente la concentración de *Bifidobacterium* y el total de anaerobios mientras que disminuyó la concentración de *Clostridium perfringes* (Sims *et al.*, 2004⁴³). En un trabajo realizado con pollos de engorda se evaluó el efecto del Bio-Mos sobre el número de *E. coli*, *Salmonella*, lactobacilos y bifidobacterias presentes en el contenido cecal. Las aves suplementadas con MOS tuvieron los números significativamente más altos de lactobacilos y de bifidobacterias (Baurhoo *et al.*, 2007⁵³). En el presente

trabajo en el tratamiento MOS fueron identificadas bacterias tales como *Clostridium leptum*, *Ruminococcus sp*, *Rumen bacterium* en el contenido del íleon y en el ciego fueron encontrados el *Ruminococcus gnavreui*, *Clostridium sp.*, microorganismos de la Familia *Lachnospiraceae* y clones de secuencias de bacterias aún no cultivadas que se han identificado en el ciego de pollo de engorda. Otras investigaciones que han empleado herramientas moleculares para estudios sobre la microbiota intestinal del pollo de engorda han mostrado que los grupos de comunidades bacterianas en el ciego más abundantes pertenecieron a bacterias Gram positivas entre las que destacan *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* además de *Fusobacterium prausnitzii*, y bacterias Gram negativas que pertenecen al grupo de Proteobacterias. Las poblaciones bacterianas que dominan la región del íleon referidas pertenecen a las familias *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae*. Algunos de estos grupos de bacterias dominantes que albergan en el íleon y ciego no se detectaron en los resultados presentados. Lo anterior puede explicarse por la diferencia entre las técnicas empleadas para la caracterización de la microbiota, los ingredientes de las dietas, diferencia entre la administración o no de aditivos, anticoccidianos, que fueron utilizados en otros trabajos de investigación. Además de las distintas condiciones para la reacción de PCR y diferencia de las secuencias en los iniciadores universales. Todo lo anterior pudo haber contribuido a la presencia o ausencia de algunos géneros bacterianos.

La técnica TGGE es una herramienta empleada para estudiar los cambios en la microbiota intestinal que se dan como consecuencia de la influencia de factores externos como los ambientales, estrés, dieta, infecciosos. La TGGE en este trabajo mostró un análisis rápido de la dinámica de las comunidades bacterianas (dominantes) presentes en las diferentes dietas tratamiento. Sin embargo esta técnica posee una limitación importante. Cuando se utiliza TGGE con iniciadores universales el límite de detección de bacterias es de aproximadamente 10^8 a 10^9 UFC/g. Este número corresponde más o menos al 1% de la microbiota en el ciego del pollo de engorda, especies de bacterias que representen <1% de la comunidad microbiana pueden ser subestimados (Muyzer et al 1993⁷³). Por otro lado el empleo de iniciadores universales para los estudios moleculares de la diversidad microbiana es insuficientemente sensible para abarcar el total de la estructura de la

microbiota intestinal por lo que se pierde información de una diversidad bacteriana real. Esta limitación puede ser corregida con el uso de iniciadores para PCR específico para cada grupo de bacterias de interés (McCartney, 2002⁷⁴; Bjerrum *et al.*, 2006⁸⁷). Además una vez obtenido el perfil de banda en el gel TTGE debe emplearse la técnica de clonación seguida de la secuenciación.

Las poblaciones de bacterias observadas en este proyecto han sido identificadas con técnicas moleculares en el tracto gastrointestinal de humanos (Zoetendal *et al.*, 1998¹⁰⁹; Favier *et al.*, 2002¹¹⁰) y otros animales como los cerdos (Pryde *et al.*, 1999¹¹¹) y los ratones (Walter *et al.*, 2000¹¹²). Otras especies bacterianas en cambio tuvieron altos porcentajes de similitud con los clones de secuencias aislados en el ciego del pollo de engorda. Se ha sugerido que los animales hospederos pueden evolucionar en conjunto con especies de bacterias específicas, mismas que se han adaptado para utilizar los carbohidratos presentes en los tejidos de cada animal hospedero (Lu *et al.*, 2003⁸⁶). Estos carbohidratos son componentes de las glicoproteínas y glicolípidos que se encuentran en la membrana celular del epitelio que reviste el tracto gastrointestinal. Los microorganismos que ocupan este hábitat han desarrollado la habilidad para utilizar estos carbohidratos específicamente como sitios de adhesión (Sharon, 2006³⁶). La microbiota intestinal puede ser entonces un reflejo de la composición de carbohidratos existentes sobre la capa de moco y en las superficies celulares del intestino en conjunto con la evolución de los mecanismos de adhesión (lectinas) y la producción de enzimas bacterianas (glicosidasas) que le permiten a la bacteria tener un mejor acceso a los nutrientes y degradar los azúcares para su metabolismo.

Aditivos moduladores de la microbiota intestinal tal como el manano oligosacárido (extraído de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) es un sustrato el cual puede bloquear la adhesión de las bacterias que expresan lectina Fimbria tipo 1 (enterobacterias) al epitelio intestinal. En el análisis de secuencias BLAST no se obtuvieron resultados relacionados con microorganismos que presentan este tipo de lectinas. Sin embargo se determinó un efecto del manano oligosacárido sobre la dinámica de algunas bacterias como *Rumen bacterium*, *Clostridium sp*, *Ruminococcus gauvreui* comparación con los tratamientos Control negativo y Control positivo.

Tiempo de Tránsito Gastrointestinal (TTG)

El TTG puede ser definido como el tiempo que toma el alimento en pasar a través del tracto gastrointestinal (TGI). En general las aves tienen un TTG relativamente más corto que los mamíferos, lo cual pudiera ser atribuido al tamaño corto de su TGI (Vergara *et al.*, 1989¹¹³). No se encontró diferencia estadística entre las dietas en el TTG. Las evaluaciones mostraron un TTG promedio de 175min. No existió interacción entre la edad y el tratamiento ($P=0.12$), hubo efecto de la edad sobre el TTG ($P<0.05$) siendo más corto a los 12 días (139min) y aumentó conforme las aves tenían mayor edad (202min). El TGI se desarrolla anatómica y fisiológicamente con la edad lo cual tiene influencia sobre el TTG. Shires *et al.* (1987¹¹⁴) mencionaron que el tiempo de retención media (TRM) incrementó conforme aumentó el PC de los pollos y que es más lento en aves adultas que en las jóvenes. Un incremento de 100gr en el PC fue asociado con un aumento en el TRM de 9.7 ± 1.7 min en todo el TGI. En varias investigaciones se obtuvieron TTG similares a las respuestas (por edad) aquí presentadas en pollos de engorda aunque en ninguna se evalúa un manano oligosacárido (Teeter *et al.*, 1985¹¹⁵; Washburn, 1991⁹⁹; Golian y Maurice, 1992¹¹⁶, Danicke *et al.*, 1999¹¹⁷; Lázaro *et al.*, 2003¹¹⁸; Nava, 2002¹¹⁹; Dávila, 2005¹²⁰) (Cuadro 6).

Se ha mencionado que el TTG puede intervenir en la nutrición de los pollos porque afecta el tiempo disponible para los procesos de digestión, absorción y por lo tanto la eficiencia en la utilización del alimento (Washburn, 1991⁹⁹, Golian y Maurice, 1992¹¹⁶). La composición de la dieta es uno de los factores primordiales que pueden influir sobre el TTG. El alimento puede contener características específicas de calidad y diferencias en cantidad de carbohidratos, fibra, proteínas, grasas y aditivos que pueden alterar el TTG (Shires *et al.*, 1987¹¹⁴, Washburn, 1991⁹⁹, Golian y Maurice, 1992¹¹⁸, Almirall y Esteve-García, 1994¹²¹). Alimentos con alto contenido de polisacáridos no almidonáseos producen un mayor TTG debido al aumento de la viscosidad intestinal lo cual interfiere con la acción de las enzimas digestivas hacia sus substratos y con el movimiento de la digesta a través del lumen intestinal. Con los resultados obtenidos se observa que el TTG no fue modificado por los tratamientos lo cual puede ser indicativo de que los procesos de digestión y absorción en el intestino se llevaron a cabo eficientemente. Los pollos de engorda han sido seleccionados

para un rápido crecimiento y una eficiente utilización de dietas altamente digestibles, en caso contrario, las aves se vuelven deficientes y su desempeño productivo se vera disminuido.

Es importante mencionar que en algunas porciones que componen el TGI el tiempo de retención del alimento es más largo que en otras. En el buche por ejemplo, 3hr después de ingerido el alimento permanece todavía la mitad de éste. En 30min ya se encuentra el marcador en todo el TGI y cantidades significativas de alimento se encuentran en el intestino delgado después de 2 a 2.5hr. Las partículas que entran en el ventrículo sufren un proceso de molido y quedan de diferentes tamaños y como consecuencia hay diferentes tiempos de retención dependientes del tamaño de la partícula (Svihus *et al.*, 2002¹²²).

Se ha demostrado que el método empleado para obtener el TTG tiene influencia sobre el cálculo. Washburn, (1991⁹⁹) reveló diferencias significativas entre administrar el marcador en el alimento, administrarlo con cápsula de gelatina y no administrar marcador, siendo este último el que proporcione el TTG más lento. Los factores que determinan el flujo del marcador a través del TGI son principalmente el tamaño de partícula, densidad e higroscopicidad (Svihus *et al.*, 2002¹²²). Vergara *et al.*, (1989¹¹³) demostraron que un marcador soluble pasó rápidamente a través del ventrículo mientras que el marcador insoluble fue retenido mayor tiempo en este órgano.

En la presente investigación el procesamiento de datos sobre el TTG emitió un coeficiente de variación alto (16.93) lo cual reflejo la excesiva variación en el TTG de los pollos. Este dato coincide con otros investigadores que utilizaron la misma metodología (Washburn, 1991⁹⁹, Golian y Maurice, 1992¹¹⁶, Almirall y Esteve-García, 1994¹²¹). Se sugiere que en estudios posteriores se realice un mayor número de repeticiones para disminuir la variabilidad.

Rendimiento en Canal

En el presente experimento fueron analizados el rendimiento en canal, el rendimiento de la pechuga y el rendimiento de la pierna con muslo. No hubo evidencia estadística de que alguno de los tratamientos fuera diferente sobre estas evaluaciones. Lo anterior coincide con otros trabajos donde se observó que el rendimiento de partes económicamente

importantes incluyendo, alas, piernas, muslo, pechuga no fueron influenciados por las dietas probadas las cuales incluyen el aditivo MOS (Fritts y Waldroup, 2003¹²³; Parks, *et al.*, 2005⁵; Sun *et al.*, 2005⁵²).

Con la forma de acción de MOS se esperaría un mejoramiento en la utilización de los nutrientes y que esto a la vez se vea reflejado en la ganancia de peso y el desarrollo del músculo. El análisis de los datos (no presentado) en este experimento reveló que las aves que tuvieron los mayores pesos en vivo generalmente tuvieron elevados rendimientos en canal, de la pechuga y de la pierna con muslo que aquellas con bajo peso.

Los MOS se han evaluado en otros aspectos de calidad de la carne. Zhang *et al.* (2005⁵⁰) demostraron que al suplementar pollos con MOS fue mejorada significativamente la terneza y la estabilidad oxidativa de la carne.

Evaluación del Grado de Pigmentación

La apariencia (factores visuales como lo son tamaño, forma, textura, brillo y color) es un importante criterio para la selección y la última evaluación de un alimento por los consumidores. La pigmentación de la piel del pollo de engorda ha sido enjuiciado como un importante atributo de calidad y fresca (Fletcher, 1992¹²⁴). El color de la piel de los pollos es debido a pigmentos carotenoides presentes en la dieta de las aves (Pérez-Vendrell *et al.*, 2001¹²⁵). Los pollos sanos absorben los pigmentos de su dieta, los cuales son transportados vía sanguínea hacia la grasa subcutánea y en la piel, donde son almacenados. Este mecanismo sufre detrimento en aves afectadas por enfermedades, especialmente por infecciones intestinales y por las infestaciones parasitarias (Tyczkowski *et al.*, 1986¹²⁶).

En México las evaluaciones por medio de colorimetría de reflectancia determinan un valor mínimo de 41 en la escala de amarillamiento (**b***) y de 2 en el enrojecimiento (**a***) para considerar el pollo como un producto bien pigmentado a nivel comercial (Fernández 2001¹²⁷). El tratamiento MOS (0.1%) presentó el mayor grado de amarillamiento (43.36) en pollo caliente que el control positivo (41.21) ($P < 0.05$). Hubo una respuesta positiva del prebiótico MO sobre este parámetro y es indicativo de un buen estado de salud intestinal en este grupo de aves que permitió una mejor absorción y deposición del pigmento.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que la técnica PCR-TGGE fue una herramienta que pudo indicar de una manera rápida la diversidad de comunidades bacterianas en el intestino del pollo de engorda y monitorear los cambios en estas poblaciones durante el tiempo y por efecto de la dieta. El análisis de secuenciación mostró que existen poblaciones de bacterias que permanecieron relativamente estables en el intestino del pollo.

El TTG no fue modificado por el MOS lo cual puede ser indicativo de que los procesos de digestión y absorción en el intestino se llevaron a cabo eficientemente. Otra evidencia de este hecho fue la mejor absorción y deposición del pigmento en piel en las aves suplementadas con MOS.

Deben continuar las investigaciones sobre el empleo de aditivos moduladores de la microbiota intestinal como el prebiótico MOS para sustentar su uso como sustituto al empleo de antibióticos promotores del crecimiento. Estos estudios deben realizarse con la utilización de diferentes herramientas moleculares y/o de cultivo para investigar la composición de la microbiota intestinal o grupos específicos de bacterias que tengan influencia en el crecimiento y salud del intestino del pollo de engorda. Se debe evaluar su efecto con diferentes ingredientes en las dietas y condiciones de crianza de los pollos.

Cuadro1. Composición de la dieta basal para pollo de engorda

<i>INGREDIENTES</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Finalizador</i>
Sorgo 9 %	546.852	612.035
Pasta de Soya 48 %	359.203	304.368
Aceite Crudo de Soya	49.474	39.425
Fosfato de Calcio	18.673	16.446
Carbonato de Calcio	15.35	13.971
Sal	4.399	3.891
DL - Metionina	2.124	1.614
Avelut		5.4
L- Lisina HCl	1.078	-
Minerales ¹	1	1
Vitaminas ¹	1	1
Cloruro de Colina 60 %	1	-
Coccidiostato	0.5	0.5
Bacitracina de Zinc	0.3	0.3
Antioxidante	0.05	0.05
TOTAL	1,000.00	1,000.00
	<i>Análisis Calculado</i>	
Proteína Cruda (%)	22	20
Lisina (%)	1.20	1.05
Metionina (%)	0.58	0.48
Metionina + Cistina (%)	0.90	0.80
Fósforo Disponible (%)	0.50	0.45
Calcio Total (%)	1	0.90
EM (Kcal/ Kg)	3000	3100

¹ Vitamina A (12000,000 UI), Vitamina D3 (2,500,000), Vitamina E (15,000 UI), Vitamina K (2.0g), Vitamina B1 (2.25g), Vitamina B2 (7.5g), Vitamina B6 (3.5g), Vitamina B12 (20 mg), Ac. Pantoténico (12.5g), Ac. Fólico (1.5g), Biotina (125 mg), Niacina (45 g), Hierro (50g), Zinc (50g), Manganeso (110g), Cobre (12g).

Cuadro 2. Efecto de la suplementación con MOS sobre el peso corporal (PC) y la ganancia de peso (GP) en pollos de engorda¹.

Parámetro	Control Negativo²	Control Positivo²	Bio-Mos²	Error Estándar
Peso Inicial	41.01	41.05	41.16	0.128
PC (g)				
0-3 sem	757	775	765	13.98
0-7 sem	3027	3095	3054	14.10
GP (g)				
0-3 sem	716	734	724	5.78
0-7 sem (gr)	2986	3054	30139	14.04

¹Los valores representan el promedio de las 6 réplicas por tratamiento. No hubo diferencia estadística entre tratamientos (P>0.05)

²Control Negativo= dieta basal; Control Positivo= dieta basal + antibiótico promotor 0.3Kg/ton; MOS= dieta basal + Bio-Mos 1kg/ton.

Cuadro 3. Efecto de la suplementación con MOS sobre el consumo de alimento (CA) y el índice de conversión alimenticia (ICA) en pollos de engorda¹.

Parámetro	Control Negativo²	Control Positivo²	Bio-Mos²	Error Estándar
CA (g)				
0-3 sem	1041	1057	1033	6.72
0-7 sem	5960	6066	6011	38.16
ICA³				
0-3 sem	1.45	1.44	1.43	1.15
0-7 sem	1.995	1.98	1.996	0.01

¹Los valores representan el promedio de las 6 réplicas por tratamiento. No hubo diferencia estadística entre tratamientos (P>0.05)

²Control Negativo= dieta basal; Control Positivo= dieta basal + antibiótico promotor 0.3Kg/ton; Bio-Mos= dieta basal + Bio-Mos 1kg/ton.

³El índice de conversión se calculó dividiendo el consumo de alimento entre la ganancia de peso.

Cuadro 4. Efecto de la suplementación con MOS sobre el rendimiento en canal, el rendimiento de la pechuga y el rendimiento de la pierna con muslo¹

Determinación (%)	Control Negativo²	Control Positivo²	Bio-Mos²	Error Estándar
<i>Rendimiento en canal*</i>	79.9	79.5	79.9	0.31
<i>Rendimiento pierna con muslo*</i>	27.7	27.4	26.9	0.23
<i>Rendimiento pechuga</i>	31.5	32.0	31.6	0.31

¹Los valores representan el promedio de los 30 pollos por tratamiento (*se eliminaron valores extremos para que los datos tuvieran una distribución Normal). No hubo diferencia estadística entre tratamientos ($P > 0.05$)

²Control Negativo= dieta basal; Control Positivo= dieta basal + antibiótico promotor 0.3Kg/ton; Bio-Mos= dieta basal + Bio-Mos 1kg/ton.

El rendimiento de la canal = (peso de la canal eviscerada X 100) / peso vivo del pollo.

El rendimiento de la pechuga = (peso de la pechuga X 100) / peso de la canal eviscerada.

El rendimiento de la pierna con muslo = (peso de la pierna con muslo X 100) / peso de la canal eviscerada.

Cuadro 5. Efecto de la suplementación con MOS sobre el grado de pigmentación del pollo de engorda¹.

Dieta²	Grado de enrojecimiento (a*)	Grado de amarillamiento (b*)
Control Negativo		
PV⁴	-2.46±0.32 ³	22.96±0.90
PC⁴	2.11±0.33	41.5±0.6 ^{ab}
Control Positivo		
PV	-1.99±0.23	22.45±0.49
PC	2.47±0.34	41.21±0.55 ^a
MOS		
PV	-2.33±0.29	24.48±0.78
PC	1.28±0.43	43.36±0.65 ^b

¹Los valores representan el promedio de los 30 pollos por tratamiento.

^{a,b} Las medias dentro de la columna que presentan diferente literal son diferentes estadísticamente significativo (P<0.05)

²Control Negativo= dieta basal; Control Positivo= dieta basal + antibiótico promotor 0.3Kg/ton; Bio-Mos= dieta basal + Bio-Mos 1kg/ton.

³Error Estándar

⁴ PV= pollo vivo; PC= pollo caliente (después del proceso de desplume)

Cuadro 6. Tiempo de tránsito gastrointestinal (TTG) en el pollo de engorda de diferentes edades¹.

Edad (días)	TTG (min)¹	Referencia
10	160	Dávila 2005¹²⁰
12	179	Mérida 2008
15	135	Nava 2003¹¹⁹
20	240	Lázaro 2003¹¹⁸
24	184	Mérida 2008
28	211	Golian y Maurice 1992¹¹⁶
30	201.3	Dávila 2005¹²⁰
36	202	Mérida 2008
42	228	Washburn 1991⁹⁹

¹ Fue registrado el tiempo en que el marcador se administró y el tiempo en el que se observó la primera evidencia de una tonalidad roja en la excreta. El TTG fue calculado como la diferencia entre estos dos tiempos de registro en minutos.

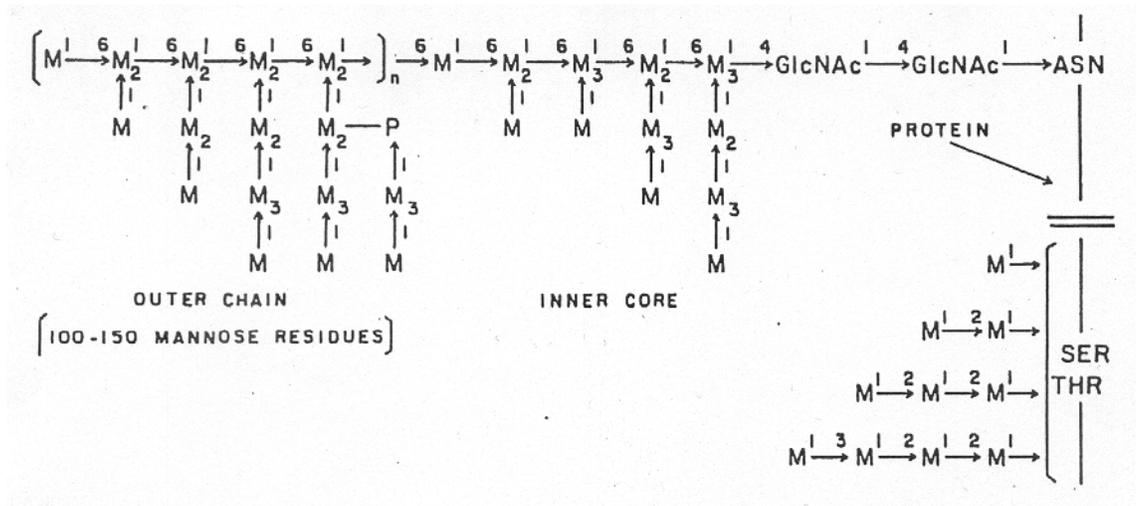


Figura 1. Estructura química de las porciones manano y glucano de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. M, manosa; GlcNAc, N-Acetil-glucosamina; ASN, asparragina; SER, serina; THR, treonina (Parodi, 1981).

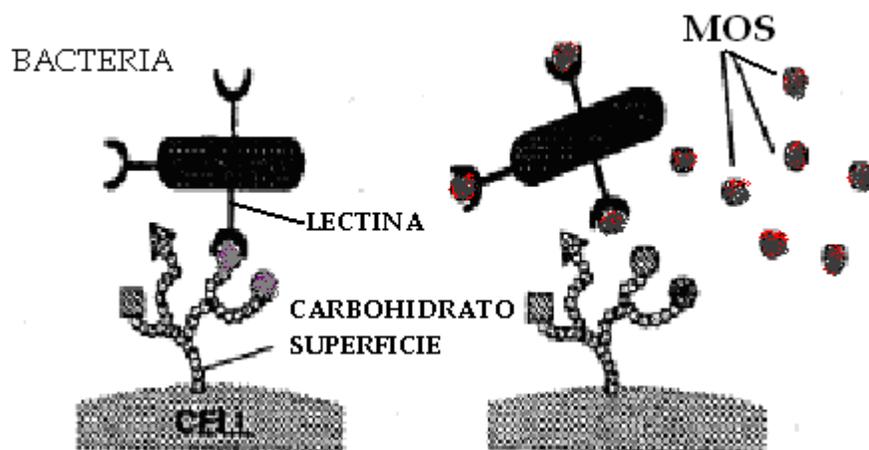


Figura 2. Modo de acción de los manano oligosacáridos. Los manano oligosacáridos tienen un efecto de adsorción de bacterias patógenas que expresan lectinas Fimbria Tipo 1. Este tipo de lectinas son comunes en numerosas especies de *E. coli*, *Salmonella* y son específicas para residuos de manosa. Si los patógenos se adhieren a este producto no se adhieren a la pared celular del intestino, no colonizan y son expulsados del intestino junto con las heces.

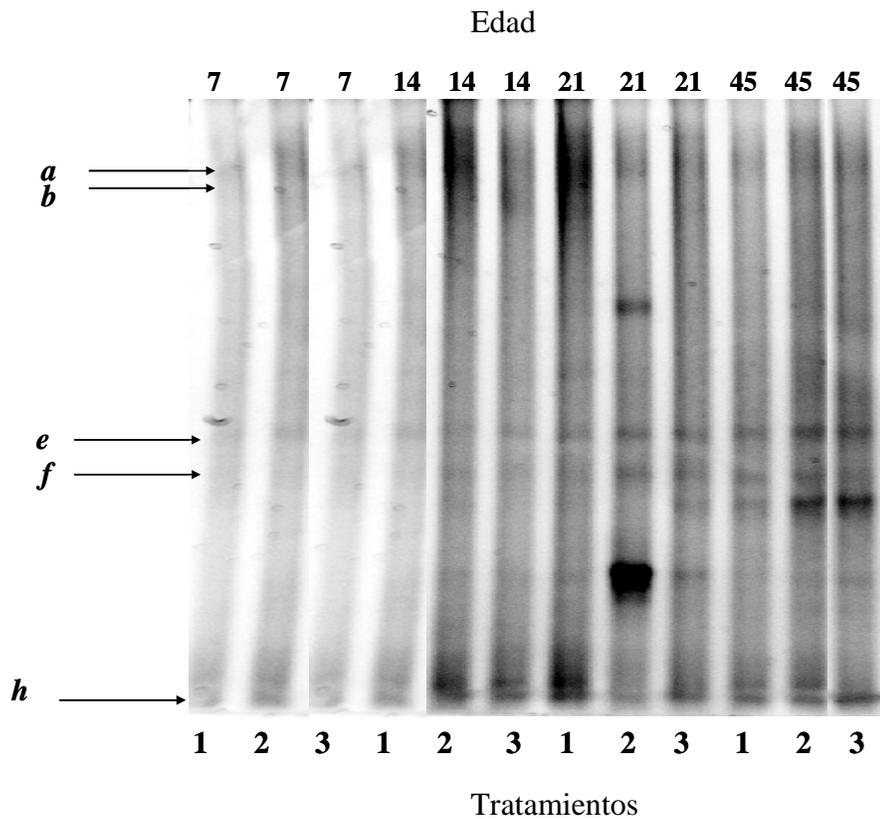


Figura 3. Patrón de Bandas en el Gel de la Electroforesis en Gradiente de Temperatura (TGGE) obtenido de muestras del contenido ileal en pollos de 7, 14, 21 y 45 días de edad utilizando iniciadores universales. La parte inferior corresponde a los tratamientos como sigue: 1) Control negativo, 2) Control positivo, 3) MOS. Los fragmentos de ADN (bandas) fueron analizados por secuenciación para obtener el género o especie bacteriana: banda **a** *Clostridium sp.*, banda **b** *Ruminococcus gauvreaui*, banda **e** DQ801263.1 en Gen-Bank (microbiota de intestino humano), banda **f** *Rumen bacterium*, banda **h** EF604703.1 en-Bank (microbiota de intestino humano).

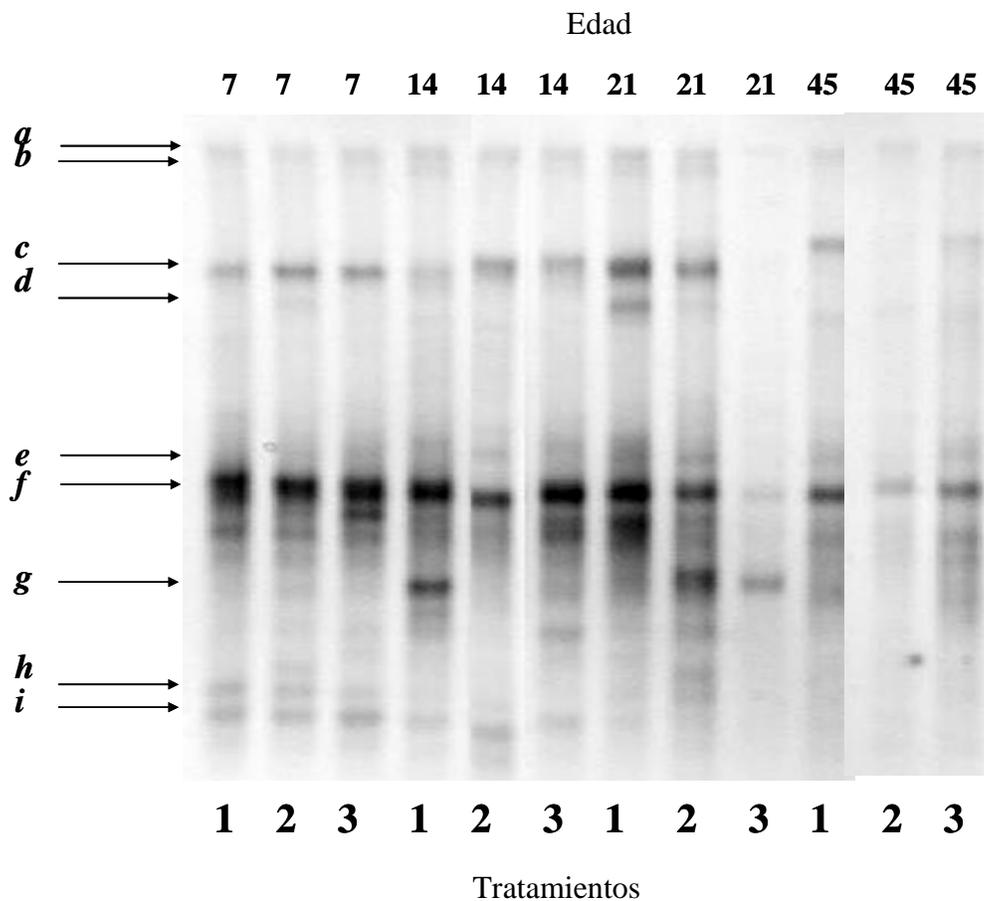


Figura 4. Patrón de Bandas en el Gel de la Electroforesis en Gradiente de Temperatura (TGGE) obtenido de muestras del contenido cecal en pollos de 7, 14, 21 y 45 días de edad utilizando iniciadores universales. La parte inferior corresponde a los tratamientos como sigue: 1) Control negativo, 2) Control positivo, 3) MOS. Los fragmentos de ADN (bandas) fueron analizados por secuenciación para obtener el género o especie bacteriana: banda *a* *Clostridium* sp., banda *b* *Ruminococcus gnavreai*, banda *c* *Lachnospiraceae*, banda *d* *Ruminococcus* sp., banda *e* DQ801263.1 en Gen-Bank (microbiota de intestino humano), banda *f* *Rumen bacterium*, banda *g* DQ342337.1 o DQ456458.1 o AF376204.1 o ABO75623.1 en Gen-Bank (bacterias localizadas en ciego de pollo), banda *h* EF604703.1 en Gen-Bank (microbiota de intestino humano), banda *i* DQ416137.1 en Gen-Bank (pertenece al subgrupo *Clostridium leptum*).

LITERATURA CITADA

1. Hinton MH. Antibiotics, poultry production and public health. *Letters in Appl Microbiol* 1986; 3: 97-99.
2. Fairchild AS, Grimes JL, Jones FT, Wineland MJ, Edens FW, Sefton, AE. Effects of Hen Age, Bio-Mos®, and Flavomycin® on Poult Susceptibility to Oral *Escherichia coli* Challenge *Poult Sci* 2001; 80:562-571.
3. Foster WH. A practical evaluation of five food additives likely to be used as growth promoters in broiler rations *Br Poult Sci* 1972; 13:123-131.
4. Owens B, Collins MA, McCracken, KJ. The effects of different growth promoters and combinations of growth promoters, on the performance and gut histology of broiler chickens. *World Poult* 2004; S62-S63
5. Parks CW, Grimes JL, Ferket PR. Effects of Virginiamycin and Mannanligosaccharide-Virginiamycin Shuttle Program on the Growth and Performance of Large White Female Turkeys. *Poult Sci* 2005; 84:1967-1973.
6. Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man *J Antimicrob Chemotes.* 1994; 34: 507-514
7. Sims MD, Dawson KA, Newman KE, Spring P, Hooge, DM. Effects of Dietary Mannan Oligosaccharide, Bacitracin Methylene Disalicylate, or Both on the Live Performance and Intestinal Microbiology of Turkeys. *Poult Sci* 2004; 83: 1148-1154.
8. Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl): 1660S:1664S
9. Guo FC, Williams BA, Kwakkel RP, Li HS, Li XP, Luo JY, Li WK, Wei YX, Yan ZT, Verstegen MW. Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on growth performance of broilers. *Br Poult Sci* 2004; .45(5): 684-694
10. Manzanilla EG; Pérez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F, Gasa J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early weaned pigs. *J Anim Sci* 2004; 82(11): 3210-8.

11. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 104-112
12. Shashidara RG, Devegowda G. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide on Broiler Breeder Production Traits and Immunity. *Poult Sci* 2003; 82:1319-1325.
13. Zdunczyk Z, Juskiewicz J, Jankowski J, Biedrzycka E, Koncicki A. Metabolic Response of the Gastrointestinal Tract of Turkeys to Diets with Different Levels of Mannan-Oligosaccharide. *Poult Sci* 2005; 84:903-909.
14. Spring P, Wenk C, Dawson A, Newman KE. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult Sci* 2000; 79: 205-211.
15. Fernandez F, Hinton M, van Gils B. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathol* 2002; 31:49-58.
16. Wagner DD, Thomas OP. Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks. *Poult Sci* 1987; 57(4):971-975
17. Savoie CJ.. Enzyme supplementation, degradation and metabolism of three U-14C-labelled cell-wall substrates in the fowl. *Br J Nutr* 1992; 67(1):91-102
18. Gaskins, H.R. Negociaciones entre la Microbiota Intestinal y el Huésped, en el Contexto de la Eficiencia en el Crecimiento Animal. XII Congreso Bienal AMENA. Pto. Vallarta, JAL. México, 2005
19. Roberfroid MB. Concepts in Functional Foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr* 1999; 129: 1398S-1401S.
20. Silveira RM; Monereo MS, Molina BB. Functional nutrition and optimal nutrition: Near or far? *Revista Española de salud Pública* 2003; 77(3): 317-331.
21. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics and sinbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J of CI Nutr* 1999; 69(5): 1052S-1057S.
22. Audisio MC; Oliver G, Apella, MC. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin sintesis of *Enterococcus faecium*. *Inter J of Food Microbiol.* 2001; 63(3): 235-241.

23. Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J of Cl Nutr* 2001; 73(2): 415S-420S.
24. Grizard D, Barthomeuf C. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Repr Nutr Develop* 1999; 39(5-6): 563-588.
25. Flickinger EA, Fahey GC Jr. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *Br J Nutr* 2002; 87(2): S297-S300.
26. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Prebiotics effects of inulin and oligofructose. *Br J of Nutr* 2002; 87(2): S193-197.
27. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 2003; 82: 627-631
28. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault, MC, Cummings, JH, Franck, A, Gibson GR, Isolauri, E, Moreau, MC, Roberfroid M, Rowland I.. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998; 80 (Suppl.1) 147S-171S.
29. Campbell JM, Fahey GC Jr, Wolf BW.. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 1997; 127: 130-136
30. Klessen B, Sykura B, Zunft HJ, Blaut M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1397-1402
31. van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, quigley M, Roberfroid M, Vliet T van, Heuvel E van den Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from de ENDO project. *Br J Nutr* 1999; 81: 121-132
32. Kok NN, Taper HS, Delzenne NM. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats. *J Appl Toxicol* 1998; 18: 47-53
33. Reddy BS. Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J Nutr* 1999; 129: 1478S-82S

34. Parodi, A.J.. The Mechanism of Synthesis of the Polysaccharide Part of Mannan in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Bioch and Bioph 1981; 210(1) 372-382.
35. Sharon N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. FEBS Lett 1987; 217 (2): 145-157.
36. Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. Bioch et Biophy Acta 1760 2006; 527-537
37. Duncan MJ, Mann EL, Cohen MS, Ofek I, Sharon N, Abraham SN. The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. J Biol Chem 2005; 280 (45): 37707-37716.
38. Sharon N y Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology 2004; Review 14 (11): 53R-62R
39. Oyofa BA, DeLoach JR, Corrier DE, Norman JO, Ziprin RL, Mollenhauer HH. Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. Avian Dis 1989a; 33: 531-534.
40. Oyofa BA, DeLoach JR, Corrier DE, Norman JO, Ziprin RL, Mollenhauer HH. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. Poult Sci 1989b; 68: 1357-1360.
41. Juskiewicz J, Zdunczyk Z, Jankowski J. Effect of adding mannan-oligosaccharide to the diet on the performance, weight of digestive tract segments, and caecal digesta parameters in young turkeys. J Anim Feed Sci 2003; (12): 133-142.
42. Zdunczyk Z, Juskiewicz J, Jankowski J, Koncicki A. Performance and caecal adaptation of turkeys to diets without or with antibiotic and with different levels of mannan-oligosaccharide. Arch Anim Nutr 2004; (58): 367-378.
43. Sims MD, Dawson KA, Newman KE, Spring P, Hooge DM. Effects of dietary mannan oligosaccharide, bacitracin methylene disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys. Poult Sci 2004; 83: 1148-1154
44. White LA, Newman MC, Cromwell GL, Lindemann MD. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. J Anim Sci 2002; 80: 2619-2628.

45. Burkey TE, Dritz SS, Nietfeld JC, Johnson BJ, Minton JE. Effect of dietary mannanoligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with *salmonella enterica* serotype typhimurium. J Anim Sci 2004; 82: 397-404.
46. Terre M, Calvo MA, Adelantado C, Kocher A, Bach A. Effects of mannan oligosaccharides on performance and microorganism fecal counts of calves following and enhanced-growth feeding program. Anim Feed Sci Technol (2006), doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.11.009
47. Strickling JA, Harmon DL, Dawson KA, Gross KL. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. Anim Feed Sci Technol 2000; 86:205-219.
48. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey C Jr. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. J Nutr 2002; 132: 980-989.
49. Iji PA, Saki AA, Tivey DR. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. J Sci Food Agric 2001a; 81: 1186-1192.
50. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB, Lee CH. Effects of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. Poult Sci 2005; 84: 1015-1021.
51. Uni Z, Geyra A, Ben-Hur H, Sklan D. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. Br Poult Sci 2000; 41: 544-551
52. Sun X, McElroy KE, Webb Jr., Sefton AE, Novak C. Broiler Performance and Intestinal Alterations when Fed Drug-Free Diets. Poult Sci 2005; 84: 1294-1302

53. Baurhoo, B, Phillip, L, Ruiz-Feria CA. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult Sci* 2007; 86(6):1070-1078
54. Nord CE, Kager L, Heimdahl A. Impact of antimicrobial agents on the gastrointestinal microflora and the risk of infections. *Am J Medic* 1984; 99-106.
55. Edwards CA, Parret A. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* 2002; 88 (Suppl. 1) 11S-18S
56. Vaughan EE, De Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. The intestinal LABs. *Anton Van Leeuw* 2002; 82(1-4): 341-352.
57. Macfarlane GT, Macfarlane S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scan J of Gastro supplement*. 1997 ; 222: 3S-9S.
58. Dunne, C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics on gut disorder. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(2): 136-145.
59. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Development microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J of Clin Nutr* 1999; (Suppl) 69(5): 1035S-1045S
60. Lan PT, Sakamoto M, Benno Y. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiol and Immunol*. 2004; 48(12): 917-929.
61. Klessen B y Blaut M. Modulation of gut mucosal biofilms. *Br J Nutr* 2005; (Suppl. 1)93: 35S-40S.
62. Klessen B, Hartman L, Blaut M.. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J of Nutr* 2001; 86(2): 291-300
63. Gibson GR, McCartney AL y Rastall RA.. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br J Nutr* 2005; 93 (Suppl 1):31S-34S
64. van der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings B y van Knapen F. Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:2536-2540.

65. Tuohy KM, Rouzaud GCM, Brück WM, y Gibson GR. Modulation of the Human Gut Microflora Towards Improved Health Using Prebiotics – Assessment of Efficacy. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(1): 75-90
66. Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Mucin Dynamics and Microbial Populations in Chicken Small Intestine Are Changed by Dietary Probiotic and Antibiotic Growth promoter Supplementation. *J Nutr* 2005; 135:187-192.
67. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesova A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2004; 93(2-3):97-108. Review
68. Apajalahti JH y Kettunen H. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. XVIII Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, 4 y 5 de Noviembre de 2002 pág. 41-51
69. Hume ME, Kubena LF, Edrington TS, Donskey CJ, Moore RW. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *PoultSci* 2003; 82: 1100-1107
70. Amit-Romach E, Sklan D y Uni Z. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poult Sci.* 2004 ; 83: 1093-98.
71. Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl. 2: S203-S211
72. Rodicio MR, Mendoza MC. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Eferm Infec Microbiol Clin* 2004; 22(4): 238-245
73. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(3): 695-700.

74. McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl. 1, S29-S37.
75. Nurmi, EV y Rantala M. New aspect of Salmonella infection in broiler production. *Nature*. 1973; 241:210-11.
76. Guan LL, Hagen KE, Tannock GW, Korver DR, Fasenko GM, Allison GE. Detection and Identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(11)
77. Lan, PTN, Sakamoto M, Benno, Y. Effects of two Probiotic *Lactobacillus* Strains on Jejunal and Cecal Microbiota of Broiler Chicken under Acute Heat Stress Condition as Revealed by Molecular Analysis of 16S rRNA Genes. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(12): 917-929.
78. Maissonier S, Gomez J, Brée A, Berri C, Baéza E, Carré B. Effects of Microflora Status, Dietary Bile Salts and Guar Gum on Lipid Digestibility, Intestinal Bile Salts, and Histomorphology in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 2003; 82: 805-814
79. Shapiro SK, Sarles WB. Microorganisms in the intestinal tract of normal chickens. *J Bact* 1949; 58:531-544
80. Mead GC, Adams BW. Some Observations on the Caecal Microflora of the Chick during the First Two Weeks of Life. *Br Poult Sci* 1975; 16:169-176.
81. Barnes EM, Mead GC, Barnum DA. The Intestinal Flora of the Chicken in the Period 2 to 6 Weeks of Age, with Particular Reference to the Anaerobic Bacteria. *Br Poult Sci* 1972; 13:311-326
82. Apajalahti JH, Kettunen A, Bedford MR, Holben WE. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(12):5656-5667
83. Apajalahti JH, Kettunen H, Kettunen A, Holben WE, Nurminen PH, Rautonen N, Mutanen M. Culture-independent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. *Appl Environ Microbio.* 2002; 68(10):4986-4995

84. van der Wielen PWJJ, Keuzenkamp LJA, van Knapen, Biesterveld S. Spatial and Temporal Variation of the Intestinal Bacterial Community in Commercially Raised Broiler Chickens During Growth. *Microbiol Ecol* 2002; 44: 286-293
85. Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(12): 5918-5924
86. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre Ch, Maurer JJ, Lee MD. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(11): 6816-6824.
87. Bjerrum L, Engberg RM, Leser TD, Jensen BB, Finster K, Pedersen K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci* 2006; 85: 1151-1164
88. Dumonceaux TJ, Hill JE, Hemmingsen SM, van Kessel AG. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(4): 2815-2823
89. Johansen CH, Bjerrum L, Finster K, Pedersen K. Effects of *Campylobacter jejuni* infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. *Poult Sci* 2006; 85: 579-587
90. Gong J, Forster RJ, Yu H, Chambers JR, Sabour PM, Wheatcroft R, Chen S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 208: 1-7
91. Lan, PTN, Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic Analysis of Cecal Microbiota in Chicken by Use of 16S rDNA Clone Libraries. *Microbiol Immunol* 2002; 46(6): 371-382.
92. Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(1): 124-137
93. Zhu XY, Joerger RD. Composition of Microbiota in Content and Mucus from Cecae of Broiler Chickens as Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with

- Group –Specific, 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Poult Sci* 2003; 82: 1242-1249.
94. Zentek J, Marquart B, Pietrzak T, Balleve D, Rochat F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2003; 87(11-12): 397-
95. Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. Effects of Dietary Fructooligosaccharide on Digestive Enzyme Activities, Intestinal Microflora and Morphology of Male Broilers. *Poult Sci* 2003; 82:1030-1036.
96. Zhang WF, Li DF, Lu WQ, Yi GF. Effects of isomalto-oligosaccharides on broiler performance and intestinal microflora. *Poult Sci* 2003; 82: 657-663
97. Chung CH, Day DF. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poult Sci* 2004; 83: 1302-1306
98. National Research Council. Nutrients Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC. 1994.
99. Washburn KW. Efficiency of Feed Utilization and Rate of Feed Passage through the Digestive System. *Poult Sci* 1991; 70:447-452
100. SAS Institute. SAS/STAT[®] Guide for the Personal Computers. Version 8.0 SAS Institute Inc., Cary, NC.
101. Waldroup PW, Oviedo-Rondon EO, Fritts CA. Comparison of Bio-Mos[®] and antibiotic feeding programs in broiler diets containing copper sulphate. *Inter J Poult Sci* 2003; 2(1): 28-31
102. Rosen GD. Holo-analysis of the efficacy of Bio-Mos[®] in broiler nutrition. *Br Poult Sci* 2007; 48(1): 21-26
103. Iji PA, Saki A, Tivey DR. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. *Br Poult Sci* 2001; 42: 514-522
104. Sklan D, Noy Y. Functional development and intestinal absorption in the young poult. *Br Poult Sci* 2003; 44(4): 651-658

105. Batal AB, Parsons CM. Effects of age on development of digestive organs and performance of chicks fed a corn-soybean meal versus a crystalline amino acid diet. *Poult Sci* 2002; 81: 1338-1341
106. Gong J, Weiduo Si, Forster RJ, Huang R, Yu H, Yin Y, Yang C, Han Y. 16S rRNA gene-based análisis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 59: 147-157
107. Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(11): 4705-4714
108. Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'Donnell AG. Probiotics shown to change bacterial community structure the avian gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5134-5138
109. Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(10): 3854-3859
110. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(1): 219-226
111. Pryde SE, Richardson AJ, Stewart CS, Flint HJ. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5372-5377
112. Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatosava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(1)

113. Vergara P, Jimenez M, Fernando C, Fernandez E, Golaños E. Age Influence on Digestive Transit Time of Particulate and Soluble Markers in Broiler Chickens. *Poult Sci* 1989; 68:185-189
114. Shires A, Thompson JR, Turner BV, Kennedy PM, Goh K. Rate of Passage of Corn-Canola Meal and Corn-Soybean Meal Diets Through the Gastrointestinal Tract of Broiler and White Leghorn Chickens. *Poult Sci* 1987; 66:289-298
115. Teeter TG, Smith MO, Sarani S. Comparison of ferric oxide and Ytterbium chloride as digesta markers in broiler chicks. *Poult Sci* 1985; 64: 2392-2393
116. 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
117. Danicke S, Vahjen W, Simon O, Jeroch H. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium, on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poult Sci* 1999; 78: 1292-1299
118. Lázaro R, García M, Mendel P, Mateos GG. Influence of enzymes on performance and digestive parameters of broilers fed rye-based diets. *Poult Sci* 2003; 82: 132-140
119. Nava MG. Alimentos funcionales: Modificación de la ecología gastrointestinal del pollo de engorda neonato con la inclusion de un prebiótico en la dieta. (Tesis de Maestría). Fac. De Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. (2002)
120. Dávila V. Caracterización y pureza de vesículas de membrana del borde de cepillo como indicador de la integridad del epitelio intestinal: valoración de dos alimentos funcionales en pollos de engorda. (Tesis de Maestría). Fac. De Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. (2005)
121. Almirall M, Esteve-García E. Rate passage of barley diets with chromium oxide: Influence of age and poultry strain and effect of β -glucanase supplementation. *Poult Sci* 1994; 73: 1433-1440

122. Svihus B, Hetland H, Choct M, Sundby F. Passage rate through the anterior digestive tract of broiler chickens fed on diets with ground and whole wheat. *Br Poult Sci* 2002; 43: 662-668
123. Fritts CA, Waldroup PW. Evaluation of Bio-Mos[®] mannan oligosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diets for turkeys. *Inter J Poult Sci* 2003; 2(1): 19-22
124. Fletcher DL. Methodology for achieving pigment specifications. *Poult Sci* 1992; 71: 733-743
125. Pérez-Vendrell AM, Hernández JM, Llauradó L, Schierle J, Brufau J. Influence of source and ratio of xanthophylls pigments on broiler chicken pigmentation and performance. *Polt Sci* 2001; 80: 320-326
126. Tyczkowski JK, Hamilton PB. Absorption, transport, and deposition in chickens of lutein diester, a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals. *Poult Sci* 1986; 65: 1526-1531
127. Fernández S. Pigmentación en avicultura. Memorias de producción avícola en nutrición y alimentación avícola. Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ, México, D.F. 2001: 150-174