

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“INTEGRIDAD INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN  
POLLOS DE CARNE ALIMENTADOS CON PROBIÓTICOS A BASE  
DE ACTINOMICETOS”**

**Presentada por:**

**ROSALÍA QUICHUA BALDEÓN**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

**Lima-Perú**

**2021**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“INTEGRIDAD INTESTINAL Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN  
POLLOS DE CARNE ALIMENTADOS CON PROBIÓTICOS A BASE  
DE ACTINOMICETOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:  
ROSALÍA QUICHUA BALDEÓN**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

**Mg.Sc. Víctor Vergara Rubín  
PRESIDENTE**

**Ph.D. Carlos Vílchez Perales  
ASESOR**

**Ph.D. Víctor Guevara Carrasco  
MIEMBRO**

**Ph.D. Nataly Bernuy Osorio  
MIEMBRO**

**Dr. Carlos Alberto Sialer Guerrero  
CO-ASESOR**

## **DEDICATORIA**

*A Dios, mi padre, por guiarme y protegerme durante toda mi vida; quien me da fuerzas día tras día para superar toda dificultad que en la vida se presenta.*

*A mis queridos padres: Pedro Quichua y Gloria Baldeón, quienes lo han dado todo por mí. Las palabras ni acciones serían suficientes para agradecerles por tanto amor y paciencia. “Con, por y para ellos”. ¡Los amo!*

*De manera muy especial a mi única hermana Mercedes y a mis hermosas sobrinas Netania y Cesia Tarrillo Quichua, porque tengo la certeza que sus éxitos futuros superarán las metas que he alcanzado. ¡Se haga la voluntad de Dios en ellas!*

## **AGRADECIMIENTO**

A PROCENCIA -CONCYTEC por su apoyo en el financiamiento de esta tesis, en el marco de la convocatoria Proyectos de Investigación Básica y Aplicada 2017-02 (Contrato N° 148-2017-FONDECYT).

Al Dr. Carlos Vílchez Perales, mi asesor y profesor, por el apoyo constante, paciencia, tiempo y los conocimientos brindados para la elaboración de la tesis y formación profesional.

Al Dr. Carlos Sialer, co-asesor, quien me brindó sus conocimientos y apoyo constante durante desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los profesores miembros del comité consejero: Mg.Sc. Víctor Vergara Rubín, Ph.D. Víctor Guevara Carrasco y Ph.D. Nataly Dolores Bernuy Osorio por su orientación académica y sugerencias vertidas para la culminación de la tesis.

Al Dr. Carlos Sialer, Dra. Heidi Horna, M.V. Daniel Molina, M.V. Sandra Espinoza y Bach. Claudia Alvarado quienes aportaron todos sus conocimientos y experiencia para la realización de este proyecto. Miembros del área de I+D+I de la empresa Ilender Perú S.A.

A la M.V. Aida Cordero, mi profesora y amiga quien me ha acompañado a lo largo de mi vida universitaria.

A mis estimados compañeros “molineros” y “sanmarquinas”: Miguel Salazar, Vanesa González, Andrea Cavassa, María Chacón, Frida y Mayra por su notable cooperación durante el proceso de ejecución de la experimentación.

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	IMPORTANCIA DE LA INTEGRIDAD INTESTINAL DEL POLLO .....	3
2.1.1.	Factores que afectan la integridad intestinal .....	5
2.2.	MICROBIOTA INTESTINAL DEL AVE.....	10
2.2.1.	Factores que afectan la microbiota intestinal .....	14
2.3.	ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO.....	15
2.4.	PROBIÓTICOS .....	17
2.4.1.	Mecanismos de acción de los probióticos.....	18
2.4.1.1.	Modulación inmunológica .....	18
2.4.1.2.	Efectos directos sobre otros microorganismos.....	19
2.4.1.3.	Efecto sobre productos dañinos.....	21
2.5.	ACTINOMICETOS .....	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1.	LUGAR Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	24
3.2.	ESTUDIO I – DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LOS ACTINOMICETOS .....	24
3.2.1.	Animales experimentales .....	24
3.2.2.	Instalaciones .....	24
3.2.3.	Materiales y equipos .....	25
3.2.4.	Productos a evaluar.....	26
3.2.5.	Tratamientos.....	26

3.2.6.	Dietas experimentales .....	27
3.2.7.	Parámetros productivos.....	30
3.2.7.1.	Peso vivo .....	30
3.2.7.2.	Ganancia de peso .....	30
3.2.7.3.	Consumo de alimento .....	30
3.2.7.4.	Índice de conversión alimenticia .....	31
3.2.7.5.	Mortalidad .....	31
3.2.7.6.	Índice de Eficiencia Productivo Europeo.....	31
3.2.8.	Peso relativo de órganos .....	31
3.2.9.	Inmunocompetencia.....	32
3.2.10.	Integridad intestinal .....	32
3.2.10.1.	Evaluación macroscópica.....	32
3.2.10.2.	Evaluación microscópica: Histomorfometría intestinal.....	33
3.2.11.	Análisis estadístico .....	34
3.3.	ESTUDIO II – DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA LA INCLUSIÓN DE LA FÓRMULA PROBIÓTICA DE ACTINOMICETOS .....	35
3.3.1.	Animales experimentales .....	35
3.3.2.	Instalaciones .....	35
3.3.3.	Materiales y equipos .....	36
3.3.4.	Producto a evaluar .....	36
3.3.5.	Tratamientos.....	37
3.3.6.	Dietas experimentales .....	38
3.3.7.	Parámetros productivos.....	42
3.3.7.1.	Peso vivo .....	42
3.3.7.2.	Ganancia de peso .....	42
3.3.7.3.	Consumo de alimento .....	42
3.3.7.4.	Índice de conversión alimenticia .....	42

3.3.7.5.	Mortalidad .....	43
3.3.7.6.	Índice de eficiencia productivo europeo .....	43
3.3.8.	Peso relativo de órganos .....	43
3.3.9.	Inmunocompetencia.....	44
3.3.10.	Integridad intestinal .....	44
3.3.10.1.	Evaluación macroscópica.....	44
3.3.10.2.	Evaluación microscópica: Histomorfometría intestinal.....	45
3.3.11.	Análisis estadístico .....	46
3.4.	ESTUDIO III – CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS .....	47
3.4.1.	Equipos y materiales.....	47
3.4.2.	Extracción del ADN cromosómico total.....	47
3.4.2.1.	Amplificación por PCR.....	48
3.4.2.2.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	49
3.4.2.3.	Purificación de ADN .....	50
3.4.2.4.	Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos seleccionados .....	50
3.4.2.5.	Taxonomía molecular por alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	51
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	52
4.1.	ESTUDIO I – DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LOS ACTINOMICETOS .....	52
4.1.1.	Parámetros productivos.....	52
4.1.2.	Peso relativo de órganos .....	61
4.1.3.	Inmunocompetencia.....	63
4.1.4.	Integridad intestinal .....	65
4.1.4.1.	Evaluación macroscópica.....	65
4.1.4.2.	Evaluación microscópica: Histomorfometría intestinal.....	68
4.2.	ESTUDIO II - DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA	

PARA LA INCLUSIÓN DEL PROBIÓTICO A BASE DE ACTINOMICETOS .....	72
4.2.1. Parámetros productivos.....	72
4.2.2. Peso relativo de órganos .....	82
4.2.3. Inmunocompetencia.....	85
4.2.4. Integridad intestinal .....	88
4.2.4.1. Evaluación macroscópica.....	88
4.2.4.2. Histomorfometría intestinal .....	92
4.3. ESTUDIO III – CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS .....	96
V. CONCLUSIONES .....	99
VI. RECOMENDACIONES .....	100
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101
VIII. ANEXOS .....	125



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Dosis (g/TM) de los productos incluidos según el tratamiento.....	27
Cuadro 2: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de inicio (0 a 10 días) .....	28
Cuadro 3: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de crecimiento (11 a 28 días).....	29
Cuadro 4: Dosis (g/TM) y concentración (UFC/g) de los productos incluidos en el alimento según el tratamiento.....	37
Cuadro 5: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de inicio (0 a 14 días) .....	39
Cuadro 6: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de crecimiento (15 a 35 días).....	40
Cuadro 7: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de acabado (36-42 días).....	41
Cuadro 8: Componentes del Master Mix para una muestra .....	49
Cuadro 9: Comportamiento productivo en pollos de carne, de la línea Cobb500, suplementados con probióticos (Período de 1 a 28 días de edad) .....	53
Cuadro 10: Peso relativo de órganos digestivos en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	61
Cuadro 11: Índice morfométrico de órganos linfoides y relación de bursa/bazo en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	63
Cuadro 12: Indicadores para la evaluación macroscópica de la integridad intestinal en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	66
Cuadro 13: Lesiones por parásitos intestinales en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación de probióticos .....	67
Cuadro 14: Histomorfometría intestinal en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	71

Cuadro 15: Comportamiento productivo en pollos de carne, de la línea Cobb500, suplementados con distintas concentraciones de probióticos (Período de 1 a 42 días de edad) .....	73
Cuadro 16: Peso relativo de órganos digestivos en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	82
Cuadro 17: Índice morfométrico de órganos linfoides y relación de bursa/bazo en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	85
Cuadro 18: Indicadores de la evaluación macroscópica de la integridad intestinal en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	89
Cuadro 19: Lesiones por parásitos intestinales en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación de probióticos .....	91
Cuadro 20: Histomorfometría intestinal en pollos de carne Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos .....	95
Cuadro 21: Secuencia de la región hipervariable V3-V4 del gen ADNr 16S de la cepas ...	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético consenso obtenido mediante el Método de Neighbour joining (Bootstrap =1000) usando el alineamiento de las secuencias de la región hipervariable V3-V4 del gen ADNr 16S de las cepas de actinomicetos P004, P009 y P025. Grupo externo utilizado representado por *Nocardia caishijiensis* ...97

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Crianza de pollos en baterias (Estudio I) .....	126
Anexo 2: Resumen del comportamiento productivo de pollos Cobb suplementados con probióticos hasta los 28 días de edad (Estudio I) .....	127
Anexo 3: Crianza de pollos en piso (Estudio II) .....	128
Anexo 4: Resumen del comportamiento productivo de pollos Cobb suplementados con probióticos hasta los 42 días de edad (Estudio II) .....	129
Anexo 5: Registro de mortalidad de aves hasta los 42 días de edad (Estudio II).....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Acido Desoxirribonucleico
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>APC</b>	Antibiótico promotor de crecimiento
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>cm</b>	Centímetros
<b>dNTPs</b>	Deoxynucleotides (desoxinucleótidos)
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetra-acetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)
<b>g</b>	Gramos
<b>G-C</b>	Relación molar de guanina + citosina en el ADN
<b>GALT</b>	Gut-associated lymphoid tissue (Tejido linfoide asociado con el intestino)
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>ISAPP</b>	International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos)
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>l</b>	Litros
<b>LAB</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>M</b>	Molar
<b>Mcal</b>	Megacalorías
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MgCl</b>	Cloruro de magnesio

<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Na</b>	Sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
<b>ng</b>	Nanogramo ( $10^{-9}$ g)
<b>NK</b>	Natural killer cell (Las células asesinas naturales)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<i>sp</i>	Especie
<i>spp</i>	Especies
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TM</b>	Toneladas métricas
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth (Caldo triptona soya)
<b>μl</b>	Microlitros
<b>UCF</b>	Unidad Formadora de Colonias
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>ul</b>	Microlitros
<b>uM</b>	Micromolar
<b>10x</b>	Solución concentrada o stock

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad probiótica de los actinomicetos, concentración óptima para su inclusión y caracterizar molecularmente las cepas utilizadas. Realizando tres estudios. En el primer estudio se utilizó 400 pollos machos de la línea Cobb 500, distribuidos en cinco tratamientos con cinco repeticiones y ocho animales cada una, siendo los tratamientos: T1 (dieta control), T2 (dieta con APC), T3 (*Bacillus subtilis*), T4 (Fórmula Probiótica I) y T5 (Fórmula Probiótica II). En el segundo estudio se utilizaron 768 pollos distribuidos en seis tratamientos con ocho repeticiones y 16 animales cada una, siendo los tratamientos: T1 (dieta control), T2 (APC), T3 (*Bacillus subtilis*), T4 (Fórmula Probiótica I-C1), T5 (Fórmula Probiótica I-C2) y T6 (Fórmula Probiótica I-C3). Cada Fórmula Probiótica (I y II) fue elaborada a base de tres cepas de actinomicetos aislados del tracto intestinal de gallinas criollas. Los resultados mostraron en el primer estudio un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la ganancia y peso vivo en los pollos que recibieron la Fórmula Probiótica I a los 28 días. El índice intestinal fue favorable con la adición de las Fórmulas Probióticas, mas no difieren significativamente con el probiótico comercial a los 28 días. En el segundo estudio, las aves que recibieron la Fórmula Probiótica I en concentración baja influyó positivamente sobre el índice productivo europeo a los 42 días. Sin embargo, la adición del Probiótico I en media y alta concentración incrementaron el índice intestinal en duodeno a los 42 días. En ambos estudios, el peso relativo de órganos, inmucompetencia y evaluación macroscópica de la integridad intestinal no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos. En conclusión, la Fórmula Probiótica I a una concentración baja ( $10^4$ – $10^5$  UFC/g) elaborada con tres cepas del género *Streptomyces*, identificadas por PCR, pueden utilizarse como aditivos en la alimentación de pollos de carne.

**Palabras clave:** actinomiceto; integridad intestinal; microbiota; pollos de carne; probiótico

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the probiotic activity of actinomycetes, the optimal concentration for their inclusion and molecularly characterize the strains used. Carrying out three studies. In the first study, 400 male chickens of the Cobb 500 line were used, distributed in five treatments with five repetitions and eight animals each, being the treatments: T1 (control diet), T2 (APC), T3 (*Bacillus subtilis*), T4 (Probiotic Formula I) and T5 (Probiotic Formula II). In the second study, 768 chickens were used distributed in six treatments with eight repetitions and 16 animals each, being the treatments: T1 (control diet), T2 (APC), T3 (*Bacillus subtilis*), T4 (Probiotic I-C1), T5 (Probiotic I-C2) and T6 (Probiotic I-C3). Each Probiotic Formula (I and II) was made from three strains of actinomycetes isolated from the intestinal tract of creole hens. The results showed in the first study a significant increase ( $p < 0.05$ ) of the gain and live weight in the chickens that received the Probiotic Formula I at 28 days. The intestinal index was favorable with the addition of the probiotic formulas, but did not differ significantly with the commercial probiotic at 28 days. In the second study, the birds that received the Probiotic Formula I in low concentration had a positive influence on the European productive index at 42 days. However, the addition of Probiotic I in medium and high concentration increased the intestinal index in the duodenum at 42 days. In both studies, the relative weight of organs, immunocompetence and macroscopic evaluation of intestinal integrity did not show statistical differences ( $p > 0.05$ ) between the treatments. In conclusion, the Probiotic Formula I a low concentration ( $10^4$ – $10^5$  CFU/g) made with three strains of the genus *Streptomyces*, identified by PCR, can be used as additives in the feeding of broilers.

**Keywords:** actinomycetes; intestinal integrity; microbiota; broilers; probiotic



## I. INTRODUCCIÓN

Con fines de prevenir y controlar enfermedades se emplearon por varias décadas antibióticos promotores de crecimiento (APC) en dosis sub-terapéuticas; sin embargo, el uso indiscriminado de los APC ha generado una preocupación mundial por lo que en la actualidad se encuentran restringidos y limitados en su uso por la evolución de la resistencia antimicrobiana entre las bacterias patógenas, peligros asociados al depósito de residuos en huevo y carne causando un impacto en la salud humana (Calvo 2004, Trafalska y Grzybowska 2004, Lutful 2009, Medina *et al.* 2018).

En el 2006, la Unión Europea prohibió el uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal, promoviendo otras alternativas como los probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgánicos y fitogénicos; estos se han utilizado como fuentes prometedoras para minimizar la incidencia de la enfermedad y lograr un mejor rendimiento en pollos (Olarve *et al.* 2007, Toghyani *et al.* 2011). Los probióticos son considerados como uno de los mejores sustitutos de los APC en la producción animal y están relacionados con el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la microbiota, inhibiendo la proliferación de microorganismos perjudiciales que ocasiona la aparición de enfermedades, estimula la respuesta inmunitaria y mejora el rendimiento productivo (Quigley 2010, Diaz *et al.* 2017).

Dentro de los probióticos más usados están aquellos que pertenecen al género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium spp.*, éstos forman parte de la microbiota normal del ave, cuya acción benéfica se atribuye principalmente a la producción de ácidos orgánicos y biocinas que inhiben el crecimiento de patógenos. También son utilizados microorganismos que no integran la microbiota normal de las aves como *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae* que han demostrado la capacidad de ejercer efectos beneficiosos en las aves (Lutful 2009, Parra 2010).

Sin embargo, para poder combatir enfermedades infecciosas de reciente aparición y para mejorar la salud animal, la búsqueda de una nueva cepa probiótica es esencial (Torres *et al.* 2013) y dentro de ellos están los actinomicetos, del género *Streptomyces*, debido a su potencial para producir valiosos metabolitos secundarios bioactivos que les confiere la capacidad de competir con otros microorganismos (Berdy 2005, García 2016). Los actinomicetos se han utilizado como probióticos en la industria acuícola con resultados positivos respecto al incremento en la supervivencia, la tasa de crecimiento, eficiencia de conversión de alimentos y prevención de infecciones intestinales (Das *et al.* 2010, Suguna y Rajendran 2012).

El uso de actinomicetos como probióticos no es común en producción avícola. Así, existen algunos reportes indicando que actinomicetos del género *Streptomyces* que han logrado pasar las pruebas *in vitro* para ser aceptados como probióticos (Latha 2016); asimismo, ha logrado ser utilizado en aves dando indicios de ser una alternativa para mejorar el estado de salud de los pollos (Lokapirnasari 2018, Martínez 2019, Bhogoju *et al.* 2021). El uso de actinomicetos aislados del tracto digestivo de gallinas criollas (exposición directa con el suelo) en dietas de pollos de engorde todavía no ha sido evaluado.

Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad probiótica de los actinomicetos aisladas del tracto digestivo de gallinas criollas y determinar la concentración óptima para su inclusión en el alimento a través de las mediciones de respuesta productiva, peso relativo de órganos, inmunocompetencia e integridad intestinal de pollos de engorde; asimismo, caracterizar molecularmente las cepas de actinomicetos utilizadas como probióticos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. IMPORTANCIA DE LA INTEGRIDAD INTESTINAL DEL POLLO

La integridad del intestino y su funcionalidad son fundamentales para lograr un desempeño eficiente en aves de carne y productoras de huevos (Edens 2003, Choct 2009). Cuando el tracto gastrointestinal está equilibrado e intacto, se absorben los nutrientes de manera más eficiente, limitando la adhesión y la replicación de los patógenos en la pared intestinal. Previene enfermedades entéricas y, en consecuencia, mejora el rendimiento de los animales, reduce la mortalidad y la contaminación de los productos (carne y huevo); de lo contrario, resultaría una pérdida económica para el productor (Edens 2003, Adedokun y Olojede 2019).

La integridad morfológica (macro y microestructural del intestino), funciones fisiológicas del tracto intestinal (digestión y absorción de nutrientes), el metabolismo de los tejidos y la energía de equilibrio, funciones de barrera desarrolladas, respuesta eficiente de la inmunidad, balance inflamatorio sostenido y, particularmente, una microbiota adecuada engloban el concepto de salud intestinal (Choque 2008, Diaz *et al.* 2019).

Kogut *et al.* (2017) proponen que la salud intestinal se puede definir como la capacidad del intestino para realizar funciones fisiológicas normales y mantener la homeostasis, lo que respalda su capacidad para resistir infecciones y agentes no infecciosos; asimismo, manifiesta que dentro de la literatura científica se usan términos, para referirse a este concepto, como salud del intestino, salud entérica u otro similares.

El tracto gastrointestinal (GI) de todo animal incluye protección contra microorganismo (infecciosos y no infecciosos), transporte de alimento ingerido y digestión a lo largo del tracto GI, digestión y absorción de nutrientes y energía, secreción de materiales endógenos, hospedaje de la microbiota intestinal y excreción de la porción no digerida del alimento ingerido y los desechos metabólicos; por tanto, un tracto GI saludable podrá llevar a cabo estas funciones de manera eficiente, mientras que un tracto GI comprometido no podrá realizar una o más de estas funciones (Yegani y Korver 2008).

El intestino es un órgano complejo y muy importante que forma parte del tracto GI, formada por una gran cantidad de vellosidades, microvellosidades y criptas que permiten la absorción de los nutrientes (Sepúlveda *et al.* 2008). Nutrientes que sirven de base para el metabolismo, mantenimiento y crecimiento del animal, además de los recursos necesarios para el adecuado funcionamiento y desarrollo del sistema inmune, óseo y nervioso (Ferket 2000, Alfaro y Briceño 2013). El aprovechamiento de los nutrientes no depende solo de la dieta (alimento balanceado y completo, formulado a base de requerimientos nutricionales) sino que requiere de un intestino saludable; alguna situación que comprometa al intestino, el bienestar y desempeño productivo se ponen en riesgo (Bailey 2013).

El intestino es el principal y más grande órgano del sistema inmune adaptativo. Siendo los desafíos infecciosos una forma común de estrés a los cuales están expuestas las aves, pudiendo resultar en la aparición de enfermedades clínicas que dependen de varios factores, como la patogenicidad del microorganismo invasor y la competencia inmunológica del ave (Suhair *et al.* 2013). Independientemente de los resultados, el sistema inmune es activado, pero afectará negativamente el crecimiento, con la disminución de los índices productivos: mala conversión alimenticia, reducción de la producción, poca pigmentación, reducción de la eficiencia del procesado y preocupación por la seguridad alimentaria. Esto va a traer como consecuencia que se vea afectado el rendimiento y la rentabilidad de las aves (Domínguez 2015). En los pollos, el setenta y cinco por ciento de las células inmunitarias se ubican en forma de tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Ortiz 2006).

El epitelio del intestino delgado se renueva continuamente por la proliferación de células de la cripta que migran hasta las vellosidades. Durante este proceso de migración, los enterocitos adquieren funciones diferenciadas en términos de digestión, absorción y secreción de mucina. El desarrollo de las criptas es un paso crucial en la maduración intestinal. Este incremento en el número y tamaño de las criptas tienen dos efectos directos: proporcionar enterocitos para incrementar el área de superficie absorptiva y aumentar la tasa de renovación celular (Geyra *et al.* 2001). La longitud y el tamaño del intestino, densidad y disposición de las vellosidades influyen sobre la capacidad de este órgano para digerir y absorber los nutrientes del alimento (Jaramillo 2012).

Asimismo, la calidad de los ingredientes de la dieta, aditivos, equilibrio de la microbiota, las secreciones endógenas y la motilidad pueden afectar la función del intestino (Barrera *et al.* 2014). Por tanto, para promover y mantener una verdadera salud e integridad funcional del intestino, clave importante para la asimilación de los nutrientes, es necesario tomar en cuenta sus propiedades fisiológicas y los probables factores que alteran su estabilidad morfológica y funcional; logrando controlar estas variables podemos esperar la máxima expresión fenotípica de las características genéticas de las líneas de aves que estamos criando (Koga 2012).

### **2.1.1. Factores que afectan la integridad intestinal**

La integridad del tracto gastrointestinal (GI) de un ave depende de varios factores, específicamente la capa epitelial; puede ser dañada principalmente por la presencia de virus (Newcastle, Gumboro), protozoarios (coccidias), bacterias, hongos, parásitos y factores antinutricionales (micotoxinas, inhibidores de tripsina, etc.). Estas afecciones pueden provocar diversas reacciones en el tracto GI: degradación de la capa de moco, destrucción de las células epiteliales, interrupción en el suministro vascular y/o un sistema inmune comprometido (Hoerr 2009).

La primera alimentación (temprana disposición del alimento), la calidad y cantidad de la dieta (composición y textura física) a una edad temprana podrían influir en la integridad del tracto GI del ave durante varias semanas (Yegani 2008). Por tanto, es importante proporcionar adecuadamente los nutrientes necesarios en el período de transición (tras la eclosión) para el desarrollo de los intestinos y órganos asociados; asimismo, mejora la absorción de yema por el intestino (Potturi *et al.* 2005, Adedokun y Olojede 2019). Potturi *et al.* (2005) indican que el retraso al acceso de alimento para las aves, luego de la eclosión presentan un desarrollo intestinal más lento y un rendimiento menor que no podrá superarse en una etapa posterior.

Los nutrientes de la dieta juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal y la población microbiana intestinal (Pan y Yu 2014). Dentro de los aminoácidos como glutamina, arginina, treonina (abundante en la mucina que recubre todo el tracto intestinal), triptófano y cisteína son vinculados con la integridad, crecimiento y desarrollo del epitelio intestinal, la expresión génica, la señalización celular, las respuestas antioxidantes y funciones inmunes asociadas (Adedokun 2019).

Waldenstedt *et al.* (2000) indican que la alta viscosidad del contenido intestinal causa problemas digestivos y de salud; por tanto, el aumento del tiempo de retención de la digesta facilitaría la colonización bacteriana. Los polisacáridos sin almidón disminuyen la velocidad de paso de digesta y por ende la disponibilidad de nutrientes. Ingredientes en la dieta como las enzimas exógenas pueden descomponer los polisacáridos sin almidón y reducir la viscosidad de la digesta, incrementan el paso de la digesta y mejoran el rendimiento de las aves (Wu y Ravindran 2004).

Tenemos también a las toxinas, de las micotoxinas, que se encuentran en algunos ingredientes dentro de los alimentos. Estos son capaces de afectar negativamente la integridad intestinal, reduciendo el desempeño productivo e incluso conducir a una alta mortalidad de aves (Yegani 2008).

Respecto a los agentes infecciosos, Ortiz (2006) considera dos aspectos importantes relacionados a la integridad intestinal, la actividad microbiana y los procesos inflamatorios. El intestino interactúa con los alimentos como con las distintas especies de bacterias comensales alojadas en la mucosa intestinal; el sistema inmune debe tener la facultad de diferenciar los microorganismos comensales de los patógenos y generar respuestas de tolerancia o inflamatoria (Sepúlveda *et al.* 2008). La presencia de microbios indeseables causa gastos de nutrientes para el proceso patológico y gasto metabólico que supone el proceso inflamatorio; la disbacteriosis y el síndrome de mala absorción son algunos de los desafíos que se pueden generar, presentándose desde subclínicas a cuadros clínicos severos (Ortiz 2006).

Los agentes infecciosos como bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* afectan la integridad intestinal (Adedokun 2019). La etiología de una enfermedad entérica es compleja, ya que se involucran combinaciones de virus, bacterias y otros agentes infecciosos como también los no infecciosos (Reynolds 2003). El daño causado por bacterias patógenas repercute en una pobre eficiencia de conversión alimenticia y, por ende, una disminución en el peso corporal de las aves; sin embargo, daños más severos resultarían en una enfermedad manifiesta con alta mortalidad (Yegani y Korver 2008).

Los parásitos intestinales como protozoarios (*Eimerias*) y gusanos otros agentes infecciosos pueden afectar la integridad intestinal (Adedokun 2019). Los pollos de carne no presentan tan comúnmente el problema con gusanos debido al corto tiempo de producción; asimismo, su crianza es aun en galpones y no al aire libre en pastizales (Thapa *et al.* 2015). Los parásitos internos más comunes y causantes de enfermedades son los protozoos, ello se debe a la crianza en confinamiento y alta densidad (McDougald 2003). Los protozoarios del género *Eimeria* causan la coccidiosis en pollos, afectando negativamente la integridad intestinal como resultado de la infección; estos parásitos presentan un ciclo de vida corto pero complejo con etapas de desarrollo alternado, las aves se infectan al ingerir los ovocitos del protozoo por medio del alimento, agua o cama en la que se cría, los oocitos eclosionan dentro del tracto GI y a la semana se manifiesta en una reducción en la ingesta de alimento y por ende ganancia de peso (Lillehoj 2000). La patogenicidad y virulencia dependerá de la especie de eimerias, causando lesiones intestinales desde moderadas a graves, generando una respuesta inmune humoral y mediada por células (Williams 2005).

Otras infecciones son causadas por virus como rotavirus, coronavirus, enterovirus, adenovirus y reovirus en las aves, disminuyen la ganancia de peso diario, disminución en el consumo de alimento y disminución de la uniformidad de la parvada. Las aves jóvenes son las más afectadas por esta infección (Yegani y Korver 2008).

El estrés es otro de los factores que podría predisponer a las aves de corral a una enfermedad entérica como el intestino permeable y enteritis. El estrés puede ser producto del ambiente (temperatura inadecuada), dieta (privación de alimento, dieta desbalanceada, alimentación subóptima y calidad de ingredientes, etc), vacunación, medicamentos, desequilibrio de microbiota y resultado de carga de patógenos (microorganismo o gusanos intestinales); el mecanismo de cada una de estas situaciones es distinta (Georgieva 2011). El estrés proveniente de un manejo inadecuado como la carencia de dietas balanceadas, agua, temperatura optima de galpón, entre otros, podrían comprometer la integridad del tracto GI (Quinteiro *et al.* 2010).

El estrés interrumpe el equilibrio entre la producción y la eliminación de especies de oxígeno reactivo (ROS), el alto nivel de ROS en las células intestinales dará como resultado la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de las células, lo que conduce a la producción de peróxidos que eventualmente podrían conducir a la producción de malondialdehído (MDA) que se relaciona con la destrucción gradual de la integridad de

la membrana celular; por ende, una mala absorción de nutrientes, morbilidad o mortalidad (Georgieva 2011). A ellos se suma, la infección de patógenos oportunistas y deficiencias de algunos nutrientes aumentando la susceptibilidad al estrés oxidativo (Bun 2011).

Alfaro y Briceño (2013) señalan que las afecciones que se dan en el intestino de las aves, pueden causar más pérdidas económicas si las comparamos con algún otro órgano o sistema del animal.

### **2.1.2. Medición de la integridad intestinal**

La integridad intestinal puede ser definida como el mantenimiento de la estructura física (enterocitos, vascularización, mucus) y funcional del intestino (absorción, respuesta inmune, impermeabilidad) (Bischoff 2011). La integridad del epitelio hace referencia al desarrollo integral (macroscópico y microscópico) y funcionamiento normal del tracto intestinal, importante desde el nacimiento hasta el final del ciclo productivo para poder cumplir con las metas de conversión alimentaria y crecimiento (Cervantes 2011).

Por tanto, existen diversos métodos para valorar la integridad intestinal; el método de puntuación de la disbacteriosis que se realiza de acuerdo con el sistema de puntuación macroscópica descrito por De Gussem (2010) y Teirlynck *et al.* (2011), sencillo de efectuar y obtener información para un diagnóstico. Smits (2001) define la disbacteriosis como un desequilibrio microbiano, cambios cuantitativos y cualitativos de las bacterias intestinales no patógenas que pueden generar perturbaciones digestivas.

El método consiste en valorar seis parámetros clínicos establecidos con dos puntuaciones de 0 (ausencia) o 1 (presencia). Para ello se deben analizar cinco pollos vivos, considerando solo la porción del intestino y este será dividido en dos partes por el divertículo de Meckel, donde se observará:

- Timpanismo o presencia de gases

Esto se observará en todo el intestino. Puntuación 0, cuando el diámetro del intestino es normal; puntuación 1, cuando el diámetro es visiblemente mayor de algunas partes del intestino conteniendo varias cantidades de líquido, grasoso, viscoso y/o contenido intestinal gaseoso.



- Inflamación de los vasos sanguíneos

Esto se observará en la porción craneal y caudal del intestino. Puntuación 0, cuando el color intestinal es normal y vasos sanguíneos no visibles; puntuación 1, cuando esta enrojecida la serosa y/o lado mucoso del intestino; y/o presencia de sangre anormalmente dilatada vasos en el lado seroso del intestino.

- Flacidez del intestino

Esto se observará en la porción craneal y caudal del intestino. Puntuación 0, cuando los bordes de la pared intestinal se doblan hacia atrás y provocan inversión de la pared intestinal; puntuación 1, cuando el aspecto es flácido de la pared intestinal inmediatamente después de la apertura del intestino.

- Contenido anormal en el intestino

Esto se observará en la porción craneal y caudal del intestino. Puntuación 0, cuando la apariencia es normal del contenido intestinal; puntuación 1, cuando la apariencia es anormal (espumosa, acuosa, mucoide, sanguinolento) del contenido intestinal.

- Delgadez y fragilidad de la pared intestinal

Esto se observará en la porción craneal y caudal del intestino. Puntuación 0, la apariencia es normal de la pared intestinal; puntuación 1, cuando es macroscópicamente visible y / o tangible la reducción del grosor de la pared intestinal, y /o translúcidas en combinación con aumento de la fragilidad del intestino.

- Alimento sin digerir

Esto se observará en la porción caudal del intestino. Puntuación 0, cuando no hay partículas de alimento no digeridas; puntuación 1, cuando hay presencia de partículas de alimento no digeridas.

Para evaluar los resultados, todos los puntajes se suman y se dividen por el número de aves evaluadas, el puntaje obtenido se divide por 2.5. El puntaje  $\leq 1.2$  es considerada como aves en buen estado mientras  $> 1.2$  se consideran como aves en mal estado (Aviapp 2020).

Así también la valoración de la presencia de coccidios, basado en la puntuación de lesiones descrito por Johnson y Reid (1970); debido a que la observación es a nivel macroscópica solo se valoran a las especies *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*) que causan tales lesiones. El método consiste en asignar puntuaciones de 0 (no hay lesión) a 4 (lesiones graves).

La *Eimeria acervulina* causa lesiones blanquecinas en la mucosa del duodeno y en infecciones mayores también en posiciones más caudales. La *Eimeria máxima* causa petequias o equimosis más visibles en la serosa del intestino medio –a veces se observan las petequias sin presencia del parásito. La *Eimeria tenella* afecta a los ciegos produciendo lesiones sanguinolentas e incluso hemorragias que llevan a la muerte del ave de forma rápida (ILP 2019).

Para evaluar los resultados, todos los puntajes de las aves se suman para *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*. El puntaje obtenido se divide por el número de pollos analizados. El puntaje  $\leq 1$  es considerado como aves en buen estado; 1-1.5, se debe tomar acciones correctivas;  $\geq 1.5$ , existe un problema y debería ser investigado (Aviapp 2020).

A nivel microscópico, generalmente se evalúa los índices histomorfométricos del intestino delgado como la altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas y la relación de ambas; esta es una técnica de gran utilidad para evaluar la integridad intestinal (Han *et al.* 2013).

## **2.2. MICROBIOTA INTESTINAL DEL AVE**

La microbiota intestinal es un componente importante del ecosistema intestinal, comprende la población de microbios que habitan en el tracto gastrointestinal (GI). El tracto GI de las aves es un refugio cálido para una microbiota compleja que consiste principalmente en bacterias anaeróbicas (Pan y Yu 2014). En el tracto gastrointestinal de las aves habita una comunidad diversa de bacterias, hongos, protozoos y virus, que interactúan constantemente con el huésped (Rinttila y Apajalahti 2013), siendo las bacterias los microorganismos predominantes (Gabriel *et al.* 2006).

Las aves manifiestan marcados cambios temporales y espaciales en la microbiota intestinal, los cambios temporales inician desde la pre-eclosión hasta que el ave es adulta (Abad *et al.* 2017). Ding *et al.* (2017) muestran que la población microbiana del pollito es transferida

durante el proceso de formación del óvulo en el oviducto de la gallina. Rinttila y Apajalahti (2013) y Donaldson *et al.* (2017) indican que la adquisición y desarrollo de la microbiota intestinal en los pollitos se origina desde su eclosión, junto con los microbios que se encuentran adheridos a la superficie de la cáscara del huevo, que corresponden a microorganismos del intestino de la madre (producción extensiva); además, las fuentes externas presentes en el medio ambiente, alimento y personal que manipula los animales.

La producción intensiva de aves implementa prácticas de higiene muy estrictas que reducen fuertemente la carga microbiana en el ambiente de eclosión para evitar la colonización por bacterias patógenas, y para que las aves recién nacidas adquieran su microbiota inicial en la granja en lugar de la fuente materna natural (Donaldson *et al.* 2017). Matté *et al.* (2017), indica que después de la eclosión, los polluelos al entrar en contacto con el ambiente externo sin necesidad de consumir agua o comida, el número de genotipos bacterianos presentes en el tracto intestinal aumenta; atribuyéndolo al proceso de manipulación, el contacto con la caja de transporte, el polvo y la vacunación, contribuyendo a la evolución de la microbiota en este periodo de la vida. Por tanto, los pollitos entregados en granja, ya tienen una microbiota pre-estructurada.

Además, Apajalahti y Kettunen (2006) indican que debido a la inocuidad de los ambientes donde se da la producción de pollitos, estos son inoculados intencionalmente para cumplir el principio de exclusión competitiva; por tanto, el inóculo aleatorio recibido puede representar especies extrañas al tracto gastrointestinal (GI), afectando el desarrollo de la microbiota, el sistema inmunitario e integridad intestinal en los pollos de carne. El efecto del primer inóculo puede perdurar toda la vida, dirigiendo el desarrollo del sistema inmune (tolerancia inmunológica) y la microbiota intestinal normal.

El principal cambio ocurre inmediatamente tras el nacimiento, ya que a nivel embrionario existe una microbiota poco desarrollada (Abad *et al.* 2017). Durante su crecimiento, los pollos picotean e ingieren continuamente partículas de la cama y, por lo tanto, adquieren una parte importante de los microorganismos que forman la microbiota intestinal. A su vez, la cama acumula materia fecal y constituye una microbiota con su propia diversidad y composición (Pan y Yu 2014).

Los microorganismos del ambiente rápidamente empiezan a poblar el tubo digestivo, posteriormente existirá un proceso de maduración y estabilización de la microbiota intestinal (Abad *et al.* 2017). A medida que el huésped crece, esta microbiota se vuelve muy diversa hasta que alcanza un estado relativamente estable pero dinámico (Pan y Yu 2014). El establecimiento de la microbiota normalmente ocurre, en pollos de carne, alrededor de las tres semanas de vida (Johnson y Foster 2018).

Las comunidades microbianas están presentes en buche, molleja, íleon, ciego y colon de pollos de carne (Stanley *et al.* 2014). Los cambios espaciales están dados por las diferentes condiciones que se dan en los compartimentos del tracto digestivo; siendo los ciegos el lugar propicio para un mayor desarrollo y establecimiento de la microbiota intestinal, pero la microbiota del intestino delgado es más fácilmente manipulable por la dieta (Abad *et al.* 2017). El tracto gastrointestinal de las aves en producción está colonizado aproximadamente por 640 especies de bacterias de 140 géneros diferentes, varía en abundancia y diversidad a lo largo del tracto intestinal, y es inferior el número de microorganismos en los que el paso del alimento es más rápido. Se estima que el número de células bacterianas supera al de las células del ave, en una relación aproximada de 10 a 1 (Gil *et al.* 2005).

El buche del pollo alberga 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> ufc/g de bacterias, que generalmente está dominada por lactobacilos (Gong *et al.* 2007). Además, *Gallibacterium* (familia *Pasteurellaceae*, filo Proteobacteria) es característica del buche de pollos (Rychlik 2020). El proventrículo y la molleja están colonizados por *Lactobacillus sp.*, debido a la resistencia del pH ácido (Wang *et al.* 2017, Matté *et al.* 2017). El estómago también está poblado por especies de Proteobacterias aún no caracterizadas (Rychlik 2020).

La composición de la microbiota en las porciones del intestino delgado es similar entre sí, aunque se requiere definir especies bacterianas específicamente adaptadas a diferentes compartimentos del intestino delgado. La microbiota ileal a veces se puede mezclar con la microbiota de origen cecal (Yan *et al.* 2019). Los microorganismos que colonizan el intestino son principalmente del filo *Firmicutes* e incluyen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Turicibacter* y *Clostridium perfringens sensu stricto* (Kollarcikova *et al.* 2019, Matté *et al.* 2017). En los ciegos, la complejidad de la microbiota aumenta, está poblado por aproximadamente 1000 especies diferentes pertenecientes al filo: Firmicutes, Actinobacterias (Gram-positivas), Bacteroidetes y Proteobacterias (Gram-negativos) (Oakley *et al.* 2014).

Una comunidad microbiana intestinal normal tiene beneficios y costos para el huésped (Dibner y Richards 2005). Dentro de los beneficios que brinda la microbiota comensal es la exclusión competitiva de los patógenos o microbios no autóctonos; por lo tanto, disminuyen el gasto de energía que las aves normalmente invierten para mantener el sistema inmune activo contra estos patógenos (Dibner y Richards 2005, Diaz *et al.* 2019). La presencia de microbiota, permite que la capa de moco intestinal aumente la secreción de mucina y la tasa de renovación de las células epiteliales, lo que mantiene el tracto gastrointestinal lubricado y evita que los microorganismos invadan las células epiteliales intestinales del huésped (Mitchell y Moretó 2006, Pan y Yu 2014).

La microbiota puede estimular el desarrollo del sistema inmunitario, incluida la capa mucosa, la monocapa epitelial, las células inmunes intestinales (células T citotóxicas y auxiliares, células productoras de inmunoglobulina y células fagocíticas) y la lámina propia. Estos tejidos construyen barreras entre el huésped y los microbios, combatiendo microorganismos intestinales indeseables (Dibner y Richards 2005, Oakley *et al.* 2014). Las inmunoglobulinas A (IgA) se unen específicamente a los epítomos bacterianos, que ayuda a regular la composición bacteriana en el intestino (Jeurissen *et al.* 2002, Suzuki y Nakajima 2014).

En el intestino distal (ciegos y colon), la microbiota también produce energía y nutrientes como vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a partir de los alimentos no digeridos, que eventualmente están disponibles para el huésped (Dibner y Richards 2005). Los AGCC tienen propiedades bacteriostáticas que son capaces de eliminar los patógenos alimentarios, como Salmonella (Ricke 2003). Asimismo, los AGCC también son una fuente de energía para los animales y pueden estimular aún más la proliferación de células epiteliales intestinales, aumentando así la superficie de absorción gastrointestinal (Dibner y Richards 2005).

La microbiota intestinal contribuye con el metabolismo de los compuestos nitrogenados del animal; las bacterias cecales pueden convertir el ácido úrico en amoníaco, utilizado por el ave para producir aminoácidos como la glutamina. Además, parte del nitrógeno de la dieta se incorpora a la proteína celular bacteriana y, estas pueden ser una fuente de proteínas (Metges 2000).

En contraste, la microbiota también incurre en costos para el animal, a nivel del intestino proximal (molleja e intestino delgado), los microbios compiten con el animal por energía y proteínas. Tanto en el intestino proximal como en el distal, los microbios producen metabolitos tóxicos (por ejemplo, catabolitos de aminoácidos) y catabolizan los ácidos biliares, que pueden deprimir el crecimiento y disminuir la digestibilidad de las aves, respectivamente (Gaskins *et al.* 2002). Por tanto, el proceso digestivo está relacionado con la microbiota intestinal; la absorción de nutrientes, la digestibilidad del alimento, captación de energía y la productividad está influenciados por la composición y diversidad de la microbiota (Mancabelli *et al.* 2016).

### **2.2.1. Factores que afectan la microbiota intestinal**

La microbiota albergada en el tracto digestivo se ve afectada cuando el ave sufre agresiones como: estrés ambiental, cambios de la dieta, desequilibrios nutricionales, intoxicaciones, vacunaciones, suministro masivo de antibióticos, mal manejo y sustancias que perturban el valor del pH del intestino. Estos factores que perturban el equilibrio de la microbiota intestinal tienen una repercusión en la salud del animal (Teirlynck *et al.* 2011, Aguavil 2012).

El efecto de los antibióticos sobre la microbiota de pollos es la reducción de la estabilidad y reducción de la población de *Lactobacillus* en el intestino (Allen y Stanton 2014, Mancabelli *et al.* 2016). Mancabelli *et al.* (2016) demostraron en un estudio que el metagenoma de los pollos alimentados con suplementos antimicrobianos presentaban una mayor abundancia de genes asociados con la resistencia a los antimicrobianos (principalmente vancomicina y cloranfenicol). Asimismo, mostraron que los pollos tratados con antibióticos presentan menos funciones asociadas con el transporte y el metabolismo de los carbohidratos.

La cama donde viven los pollos generalmente está compuesta de viruta, cáscaras de arroz u otros materiales vegetales, los cuales se mezclan con el alimento, agua y excretas; los materiales utilizados como sustrato para la cama pueden alterar la morfología y fisiología del intestino y la composición de la microbiota intestinal (Wang *et al.* 2018).

### 2.3. ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Los antibióticos son moléculas naturales, producidas por un organismo vivo (hongo o bacteria), de forma sintética o semisintética, que tiene la capacidad de inducir muerte (bactericidas) o detener el crecimiento de bacterias (bacteriostatos), virus u hongos (Seija y Vignoli 2008).

El uso de antibióticos veterinarios, como tal, puede tener tres propósitos distintos según sea el uso. Primero como uso terapéutico, son un elemento clave para combatir enfermedades infecciosas y desde su aparición han permitido disminuir la mortalidad asociada a estas patologías de forma muy significativa; los animales se exponen a altas dosis en un corto periodo de tiempo y así se previene el contagio del agente infeccioso a los demás animales (Kocher *et al.* 2004, Alvo *et al.* 2016) y reduce la expulsión vía fecal del patógeno (Lekshmi *et al.* 2017). Segundo como uso preventivo o profiláctico, en esta estrategia los animales se tratan a concentraciones elevadas (en alimento o agua) por un largo periodo de tiempo y se puede prevenir la aparición de brotes. El tercer uso es como promotor de crecimiento, la dosis es a concentraciones muy bajas incluidos también en la dieta del animal y busca aumentar la masa corporal mejorando la productividad (Economou y Gousia 2015), produciendo una ganancia de peso estimada alrededor del 5 por ciento (Torres y Zarazaga 2002).

La Organización Mundial de la Salud indica que los términos agentes promotores de crecimiento son sustancias distintas a los nutrientes de la ración que aumentan el ritmo de crecimiento y mejoran el índice de conversión de los animales sanos y correctamente alimentados” (Silván 2006). Los promotores de crecimiento son usados principalmente en animales de granja, cuyo propósito es promover el crecimiento, mejorar la distribución de grasa y proteína, y contribuyen al aumento de la eficiencia en la tasa de conversión alimenticia (Ileana 2007, Toldrá *et al.* 2016).

Los antibióticos promotores de crecimiento son adicionados al alimento en bajas dosis y por períodos prolongados; actúan principalmente en el sistema digestivo de dos formas: ayuda a establecer la microbiota intestinal óptima y mejora la eficacia de utilización de los alimentos. El efecto positivo puede ser expresado a través del aumento del apetito, mejor conversión alimenticia, estimulación del sistema inmune, aumento de la vitalidad y regulación de la microbiota intestinal (Ileana 2007, Perić *et al.* 2009).

La producción avícola emplea estos antibióticos como promotores de crecimiento ocasionando que los microorganismos se adapten y aumenten la resistencia a ciertos antibióticos; la resistencia antimicrobiana no solo está relacionada al uso indiscriminado en la dieta sino también a la falta de control en los tratamientos (Berglund 2015). La evidencia científica muestra que el uso desmesurado de los antibióticos ha creado el problema de resistencia a los antibióticos (Forgetta *et al.* 2012, Furtula *et al.* 2010), y residuos de antibióticos en los alimentos y en el medio ambiente (debido a su alta administración en humanos y animales, persisten en la naturaleza en transformación y bioacumulación) (Carvalho y Santos 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a los antibióticos es un problema serio que compromete a la salud humana y animal (Diarra *et al.* 2010, Lin 2014). Los antibióticos se han convertido en una amenaza para la salud humana, causada por el riesgo de la transferencia de bacterias resistentes. La diseminación puede ocurrir por contacto directo con los animales o indirectamente por los alimentos, agua, y la aplicación de los residuos animales a los campos agrícolas (Marshall y Levy 2011). Además, algunos agentes antimicrobianos que se utilizan en la alimentación animal son similares a los que se utilizan en medicina humana, lo que conlleva a que las bacterias resistentes en los animales, también sean resistentes a antimicrobianos de uso humano (Knobler *et al.* 2003).

Por lo tanto, existe una necesidad creciente de encontrar alternativas naturales efectivas para controlar las enfermedades infecciosas y limitar la propagación de bacterias resistentes, pero lo que es más importante, hacer que los antibióticos sean una herramienta útil para el futuro. Algunos de los reemplazantes que se han ido planteando e investigando son las enzimas exógenas, prebióticos, probióticos, extractos de plantas y acidificantes, los cuales podrían limitar el número de bacterias patógenas, mejorar la capacidad de absorción del intestino y mejorar el rendimiento productivo (López *et al.* 2009, Huyghebaert *et al.* 2011, Urbano 2018), permitiendo ofrecer al consumidor un producto seguro desde el punto de vista sanitario y accesible económicamente (Ardoino *et al.* 2018).



## 2.4. PROBIÓTICOS

La palabra "probiótico" deriva de una palabra en griego que significa "para la vida" o "a favor de la vida", siendo modificado el significado con el paso de los años (Azizpour *et al.* 2009). Los probióticos son microorganismos con efectos beneficiosos sobre la salud del huésped después de la ingestión e incluyen *Lactobacillus* (LAB), *Bifidobacterium*, *Bacillus* y levadura; siendo LAB el primer probiótico descubierto (König y Fröhlich 2009).

La Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP) organizó una reunión de expertos clínicos y científicos en probióticos para poder redefinir su concepto, definiéndolos como “microorganismos vivos estrictamente seleccionados que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (Hill *et al.* 2014).

Los probióticos pueden provenir de una microbiota indígena, es decir, puede ser un subcultivo del contenido intestinal del animal o una microbiota ajena a la intestinal. Asimismo, puede estar formada por varias especies o un solo microorganismo, siendo más eficaz contra más microorganismos cuando su composición es más variada (Patterson y Burkholder 2003). Su uso podrá ser para distintas especies de animales, tendrán menos efectos adversos y cumplirá mejor con las características ideales de un probiótico (Timmerman *et al.* 2004, Chapman *et al.* 2011).

La dosis, el tiempo y la duración de la administración de probióticos puede ser un factor que afecta la eficacia (Sazawal *et al.* 2006) como también la edad de los animales, los patrones de colonización son inestables y los animales recién nacidos son susceptibles a los patógenos ambientales; por tanto la colonización inicial es de gran importancia para el huésped porque las bacterias pueden modular la expresión de genes en las células epiteliales creando así un hábitat favorable por sí mismos (Siggers *et al.* 2007).

Gorbach (2002), Patterson y Burkholder (2003) consideran algunos criterios que las cepas deben tener para que formen un probiótico ideal: ser originaria del huésped y así resista al ácido gástrico, bilis y secreciones pancreáticas, modulen la respuesta inmune, capaces de fijarse a las células epiteliales, no patógenas, soporten los procesos tecnológicos y de almacenamiento, produzcan sustancias antimicrobianas y brinde efectos benéficos en la salud.

Diaz *et al.* (2017) concluyeron que los probióticos, actualmente son una alternativa potencial de reemplazo a los antibióticos utilizados como subterapéuticos, a modo de promotores de crecimiento. Su ventaja es que no dejan residuos en el huevo ni en la carne del ave y no generan riesgo de resistencia antibiótica en la microbiota humana. Además, contribuye al mantenimiento de la integridad y estabilidad de la flora intestinal, lo que dificulta la proliferación de microorganismos perjudiciales, lo cual ayuda a prevenir la aparición de enfermedades y a mejorar el rendimiento productivo.

#### **2.4.1. Mecanismos de acción de los probióticos**

El mecanismo de acción de los probióticos que ejercen efectos biológicos aún no se conoce en su totalidad, pese al gran número de estudios que tratan de explicar los posibles mecanismos mostrando los términos como resistencia a la colonización o exclusión competitiva se utilizan a menudo para explicar su modo de acción; aun se necesitan más estudios para dilucidarlos.

Oelschlaeger (2010) clasifica tres modos de acción de los probióticos, los cuales están implicados en la defensa contra infecciones y en estabilizar o reconstituir el equilibrio fisiológico entre la microbiota intestinal y el huésped. Por otro lado, Hernandez *et al.* (2019) considera dos mecanismos básicos de los probióticos para la inhibición de patógenos: exclusión competitiva (involucra la producción de compuestos inhibidores, prevención de la adhesión de patógenos, competencia por nutrientes y reducción de la biodisponibilidad de la toxina) y modulación del sistema inmunológico del huésped, tanto innato como adaptativo. Sin embargo, hasta la fecha no hay probiótico que exhiba todos los principios o al menos no en la medida en que pueda ser efectivo.

##### **2.4.1.1. Modulación inmunológica**

La influencia de los probióticos puede ser directa o indirecta sobre el sistema inmune; la influencia directa es ejercida por diferentes especies de *Lactobacillus* que aumentan los niveles de citocinas y anticuerpos (Haghighi *et al.* 2006; Brisbin *et al.* 2011). De forma indirecta, los probióticos promueven el crecimiento de otras bacterias como *Lactobacillus agilis* y *Lactobacillus salivarius* que tienen la capacidad de estimular la producción de butirato microbiota y restablecer el equilibrio de la microbiota (Meimandipour *et al.* 2009).

Los probióticos pueden estimular el sistema inmunológico tanto innato como adquirido mediante los metabolitos que producen, componentes de la pared celular y ADN. Asimismo, los efectos inmunomoduladores podrían incluso lograrse con bacterias probióticas muertas o simplemente con fragmentos de peptidoglicano. Siendo este un mecanismo que le contribuye al huésped protección. Los metabolitos son reconocidos por las células del huésped; las principales células diana son las células inmunitarias asociadas al intestino y el epitelio intestinal. La interacción de los probióticos con las células del huésped (epiteliales) por adhesión en sí misma podría desencadenar una cascada de señalización que conduzca a la modulación inmunitaria (Oelschlaeger 2010).

Dentro de los efectos ejercidos en el sistema inmune innato, se puede observar la capacidad que poseen los probióticos de aumentar la actividad de las células natural killer (NK), que se destacan por su efecto citotóxico y por producir citoquinas que actúan como inmunomoduladores y agentes proinflamatorios (Matsuzaki y Chin 2000). Por otro lado, se ha estudiado otro mecanismo antiinflamatorio de los probióticos en el que algunos de sus productos metabólicos tienen la capacidad de interactuar con receptores de señalización como el NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B), lo cual evita la producción de agentes inflamatorios que afecten la integridad de la mucosa intestinal (Lescheid 2014).

Además, se ha demostrado que la adición de probióticos en la dieta posee efectos quimiotácticos, mediados por citoquinas, metaloproteinasas y prostaglandinas, que estimulan la respuesta inmune celular, lo que aumenta la producción de inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgY) y la migración de linfocitos T (Yang y Choct 2009, Bai *et al.* 2013).

#### **2.4.1.2. Efectos directos sobre otros microorganismos**

Los probióticos producen metabolitos contra los microorganismos indeseables, como peróxido de hidrógeno, diacetilo y ácidos orgánicos de cadena corta (ácido láctico, acético y propiónico) (Tiwari *et al.* 2012). Estos acidifican el medio intestinal creando un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos nocivos, reduciendo la velocidad de multiplicación y empiezan a sucumbir al no encontrar un ambiente adecuado. El peróxido de hidrógeno tiene un efecto bactericida atribuido a su potente acción oxidante, destruyendo componentes celulares. El diacetilo inhibe el desarrollo de microorganismos gram negativos al interaccionar con el metabolismo de la arginina, impidiendo la utilización de este aminoácido (Marlli 2013).

Otras sustancias antimicrobiales producidas por los probióticos son las bacteriocinas (nisina, acidolina, acidofilina, lactocyna, lactocydina, reutryna, laktolina, entrocina) que tienen una alta actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* (Kailasapathy y Chin 2000, Kim *et al.* 2015). También, las bacterias probióticas producen los denominados ácidos biliares desconjugados, los cuales derivan de las sales biliares; muestran una actividad antimicrobiana más fuerte en comparación con las sales biliares sintetizadas por el organismo. Pero, aún queda por investigar cómo se protegen los probióticos de estos metabolitos o si son resistentes a los ácidos biliares desconjugados (Oelschlaeger 2010).

Existe competencia entre los microorganismos por recursos limitados como el hierro, el cual es un elemento esencial para casi todas las bacterias a excepción de los lactobacilos. Siendo una ventaja importante en la competencia con otros microorganismos que dependen del hierro (Weinberg 1997).

Las bacterias probióticas pueden adherirse a las células epiteliales, bloqueando así la adherencia de los patógenos siendo el primer paso en la patogénesis; este mecanismo es importante para el efecto probiótico en el huésped porque se comporta como una barrera defensiva al impedir que el espacio del epitelio celular (sitios de adhesión) quede disponible para los patógenos. El efecto anti-adhesivo podría ser el resultado de la competencia entre el probiótico y el patógeno por el mismo receptor de la pared intestinal o la inducción por parte de los probióticos de mayor producción de mucina (Patterson 2003, Oelschlaeger 2010, Chávez 2014).

Los pollitos nacen con un sistema digestivo estéril, y antes de que su organismo pueda producir sus propios anticuerpos ya los microorganismos del ambiente comienzan a colonizar el sistema digestivo (Yang y Choct 2009). Por tanto, la introducción de bacterias probióticas debe ocurrir temprano en la vida, de modo que las bacterias se establezcan preferentemente en el sistema gastrointestinal para volverse competitivas o antagónicas a los patógenos oportunistas (SCAN 2000).

### **2.4.1.3. Efecto sobre productos dañinos**

El tercer modo de acción se basa en las acciones que afectan, contrarrestando los productos microbianos como las toxinas o productos del huésped como sales biliares e ingredientes alimentarios. Esta acción puede dar como resultado la inactivación de toxinas, la desintoxicación del huésped y de los componentes de los alimentos en el intestino (Oelschlaeger 2010).

El modo de acción de los probióticos en los pollos mantiene la microbiota intestinal normal mediante exclusión competitiva y antagonismo, altera el metabolismo al aumentar la actividad enzimática digestiva disminuyendo la actividad enzimática bacteriana y la producción de amoníaco, mejora el consumo de alimento y la digestión, y estimula el sistema inmune (Kabir 2009).

Los beneficios esperados tras la administración de probióticos son: la estimulación del desarrollo de microbiota beneficiosa, reducción y prevención de colonización por patógenos entéricos, modulación de la actividad inmunológica, estimulación de la salud epitelial, aumento de la capacidad digestiva, y ayuda en la maduración del tejido intestinal (Syngai *et al.* 2016).

## **2.5. ACTINOMICETOS**

Los actinomicetos u orden de los *Actinomycetales* son bacterias aeróbicas Gram positivas con alto porcentaje de G-C, capaces de formar filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales (Ezziyani *et al.* 2004, Macagnan *et al.* 2008). Es caracterizada por un ciclo de vida complejo perteneciente al filo *Actinobacteria*, la cual constituye uno de los filos más grandes dentro de 18 linajes principales reconocidos actualmente dentro del Dominio *Bacteria*. Algunos miembros de este filo han adoptado diferentes estilos de vida pudiendo ser patógenos (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tropheryma* y *Propionibacterium*), habitantes del suelo (*Streptomyces*), comensales de plantas (*Leifsonia*) o comensales gastrointestinales (*Bifidobacterium*) (Ventura *et al.* 2007).

Se encuentran distribuidos ampliamente en el ambiente, en superficies rocosas en suelo rizosférico, ricos en humus, hojarasca, estiércol y sedimentos marinos; una característica peculiar de los actinomicetos es que emiten un olor a suelo húmedo debido a la producción del metabolito geosmina (Leiva *et al.* 2004). La mayoría de las especies son heterótrofas,

aerobios (algunas son anaerobias), mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25°C a 30°C y son poco tolerantes a la acidez, razón por la cual requieren pH neutro para su óptimo crecimiento, pese a que crecen en un rango de pH de 5 a 9 (El-Tarabily y Sivasithamparam 2006, Franco 2008).

La actividad metabólica de los actinomicetos, frecuentemente está acompañada por la producción de metabolitos secundarios de gran diversidad química, que desempeñan un papel primordial en el mantenimiento, señalización y colonización de su hábitat. Los metabolitos secundarios sirven como precursores para la biosíntesis de agentes anticancerígenos, fármacos, inmunorreguladores, antivirales y agentes antiparasitarios (González *et al.* 2005, Prashith *et al.* 2010). Por tal motivo, los actinomicetos son importantes debido a ese gran potencial de producir compuestos biológicamente activos; siendo productores del 45 por ciento de compuestos bioactivos obtenidos a partir de microorganismos (Berdy 2005).

Los *Streptomyces* son productores de la mayoría de los antibióticos de uso frecuente en clínica humana y animal, estimándose una producción de más del 80 por ciento de los compuestos bioactivos microbianos que se han descubierto en los últimos 50 años; siendo algunos de ellos: la fosfomicina, estreptomicina, lincomicina, eritromicina y tetraciclina (Berdy 2012, Ullah *et al.* 2012, Valli *et al.* 2012). La propiedad más interesante de este género es la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos como anti fúngicos, antivirales, antitumorales, antihipertensivo, inmunosupresores y especialmente antibióticos. La producción de la mayoría de los antibióticos es específica de la especie, y estos metabolitos secundarios son importantes para las especies del género *Streptomyces*, ya que les confieren una capacidad especial para competir con otros microorganismos con los que entran en contacto, incluso con especies del mismo género (Prócopio *et al.* 2012, García 2016). Una característica morfológica de este género es la capacidad de formar hifas que pueden diferenciarse en una cadena de esporas (Lanoot 2005).

Según Garrity *et al.* (2004), el género *Streptomyces* pertenece a la familia *Streptomycetaceae*, suborden *Streptomycineae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria*, filo *Actinobacteria* y dominio *Bacteria*.

Hasta la fecha existen mínimos estudios sobre la aplicación de actinomicetos, sobre todo *Streptomyces*, como probióticos en la crianza de aves; la mayoría de los probióticos utilizados en la alimentación de aves ha sido a base de microorganismos como *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Bifidobacterium*, *Candida*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Megasphaera*, *Pediococcus*, *Saccharomyces* y *Streptococcus* (FAO 2016). En acuicultura, las investigaciones realizadas utilizando *Streptomyces* han dado resultados óptimos como actividad inhibitoria frente a patógenos de peces (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* y *Edwardsiella tarda*), mayor tasa de crecimiento, reducción de mortalidad y aumento de la actividad enzimática (García 2016).

Dentro de la avicultura, existen estudios con *Streptomyces*, dada su importancia económica y médica en la producción de antibióticos. Latha *et al.* (2016) realizaron estudios con 18 cepas de actinomicetos aisladas a partir de las heces de pollos; pruebas como la capacidad para sobrevivir en pH ácido, exposición a la bilis y pancreatina, propiedades de adhesión, susceptibilidad a antibióticos y actividad no hemolítica. Mostrando solo una cepa, *Streptomyces sp.* JD9, con características de adaptación a los diversos enfrentamientos realizados, al identificarla molecularmente mostró similitud con la especie *S. malachitospinus*; se almacenó la información en la base de datos NCBI con KF878075.

En una reciente investigación hecha por Martínez *et al.* (2019) evaluaron la actividad probiótica de *Streptomyces sp.* RL8 en indicadores fisiológicos y productivos en pollos de la raza Leghorn, mostrando ser una alternativa para mejorar el estado de salud de los pollos, a través de la estimulación de parámetros hematológicos y modulación del sistema inmune de las aves.

Asimismo, Bhogju *et al.* (2021) evaluaron *Lactobacillus reuteri* y *Streptomyces coelicolor* como bacterias probióticas, de forma conjunta y separada, fueron encapsuladas y agregadas al alimento para pollos de engorde a una concentración de 100 mg / kg de pienso. El grupo de aves que recibió *Streptomyces coelicolor* mostró un aumento no significativo de la pechuga; por otro lado, el consumo de alimento fue menor mientras la ganancia de peso y conversión alimenticia no mostraron diferencias significativas respecto al control. Este es el primer estudio que demuestra el efecto de *Streptomyces coelicolor* en pollos de engorde como probiótico.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

La fase experimental de la presente investigación se desarrolló mediante dos estudios; el primer estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Nutrición y Alimentación de Aves (LINAA) de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria la Molina, durante los meses de enero y febrero del año 2020. El segundo estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de noviembre y diciembre del 2020.

La fase descriptiva de la presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Área de Investigación, Desarrollo e Innovación de Ilender, ubicado en Santa Clara, en el distrito de Ate, durante los meses de enero y mayo del 2021.

#### **3.2. ESTUDIO I – DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LOS ACTINOMICETOS**

##### **3.2.1. Animales experimentales**

Para la determinación de la actividad de las fórmulas probióticas a base de actinomicetos se utilizaron 400 pollos BB machos de la línea genética Cobb 500 de un día de edad, los cuales fueron distribuidos en cinco tratamientos con ocho repeticiones y diez pollos por repetición. Dichas unidades experimentales estuvieron distribuidas en dos baterías metálicas por 28 días.

##### **3.2.2. Instalaciones**

Los pollos BB se alojaron en dos baterías metálicas, con calefacción eléctrica controlada por termostatos, de cinco pisos cada una y cada piso dividido en dos compartimentos (89 cm x 84 cm). Asimismo, cada compartimento fue dividido en dos usando una malla metálica galvanizada para obtener las 40 unidades experimentales de 89 cm x 42 cm cada una. Cada



unidad experimental contó con comederos lineales de 58 cm, bebederos tipo BB y bebederos lineales de 87 cm. El ambiente estuvo iluminado por las noches con focos individuales, considerando el programa de iluminación de la guía de la Línea Cobb500.

Las instalaciones fueron preparadas con anticipación previas a la recepción de los pollos BB, se adecuó un microclima con mantas, alambre y clavos para mantener la temperatura óptima, a su vez, se realizó la desinfección completa del ambiente y utensilios para la crianza; para el monitoreo de la temperatura y humedad relativa se utilizó un termo higrómetro.

### **3.2.3. Materiales y equipos**

Los materiales y equipos que se utilizaron para la crianza y obtención de datos fueron los siguientes:

- Baterías eléctricas metálicas de 5 pisos
- Focos de 60 W
- Pulverizador
- Cortinas tipo manta
- Malla galvanizada
- Balanza digital, 6 Kg
- Balanza digital, 3 Kg
- Termohigrómetro digital
- Bebederos tipo tonguitos
- Bebederos lineales
- Comederos lineales
- Cámara fotográfica
- Periódicos
- Jabas
- Materiales de limpieza (escoba, tacho, recogedor, detergentes, manguera, baldes)
- Hojas de registro y materiales de escritorio

### **3.2.4. Productos a evaluar**

Se evaluó la actividad probiótica *in vivo* de cepas pertenecientes al filo actinomicetos que fueron aisladas del tracto digestivo de gallinas "criollas" de la comunidad de Chota Cajamarca, realizado por Ramos (2019). Las cepas se seleccionaron por su potencial probiótico *in vitro* realizado en el Laboratorio de Ilender; considerando solo seis cepas, agrupándolas de tres y resultando en dos fórmulas probióticas.

La Fórmula Probiótica I fue elaborada por tres cepas: P004, P009 y P025; mientras, la Fórmula Probiótica II fue elaborada por: P026, P032 y P034. Las seis cepas utilizadas pertenecen al filo *Actinomiceto* y género *Streptomyces* según la caracterización morfológica y fisiológica de Ramos (2019). La dosis considerada para ambas formulaciones fue de 100 g/TM de alimento balanceado.

Uno de los productos utilizados como antibiótico promotor de crecimiento (APC) fue Performance T25 (Tilosina) en dosis de 200 g/TM de alimento balanceado. Adquirido de la Empresa Ilender Perú S.A.

El otro producto utilizado como probiótico comercial fue Calsporin® que contiene  $1 \times 10^{10}$  UFC/g de una cepa de *Bacillus subtilis* C-3102 que fue administrado a una dosis de 100 g/TM de alimento balanceado.

La administración de los productos se realizó durante la preparación del alimento, para las dos fases de alimentación. Por tanto, su presencia y suministro fue durante todo el estudio del experimento. Al finalizar la preparación y a mediados de la crianza, se tomaron muestras de alimento para verificar la presencia de las cepas contenidas en las nuevas formulaciones de probióticos.

### **3.2.5. Tratamientos**

Los tratamientos se establecieron de acuerdo a la inclusión del antibiótico promotor de crecimiento (APC), probiótico comercial y de las formulaciones probióticas I y II a base de actinomicetos (Cuadro 1).

**Cuadro 1: Dosis (g/TM) de los productos incluidos según el tratamiento**

Tratamientos	Dosis de productos (g/TM)
T1 Dieta control	0
T2 Dieta con APC	Tilosina 200
T3 Dieta con probiótico comercial	100
T4 Dieta con Fórmula Probiótica I	100
T5 Dieta con fórmula probiótica II	100

*Nota:* APC=antibiótico promotor de crecimiento, g/TM= gramos por tonelada métrica

### **3.2.6. Dietas experimentales**

La elaboración de las dietas experimentales se realizó en la Planta de Alimentos del Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos (PIPSA), Facultad de Zootecnia de la UNALM. Las formulaciones de las dietas se realizaron utilizando el software DAPP, considerando las especificaciones nutricionales del manual de la Línea Cobb 500 (Cobb-Vantress 2018).

El programa de alimentación se elaboró para dos fases: inicio para la etapa de 0 a 10 días y crecimiento para la etapa de 11 a 28 días. La dieta se formuló usando insumos convencionales; las composiciones porcentuales de las dietas experimentales y su valor nutricional para la fase de inicio y crecimiento se presentan en el Cuadro 2 y Cuadro 3, respectivamente. La presentación física del alimento en la experimentación para ambas etapas fue en harina.

Se añadió un anticoccidial, Salinocarb (Salinomicina Sódica y Nicarbazina) en dosis de 500 g/TM de alimento balanceado. Este solamente fue administrado en el tratamiento dos (T2) debido a que presentan una acción antibiótica, a pesar que su accionar principal es contra coccidios. Por tanto, con el fin de evitar alguna alteración con los productos a evaluar se evitó su administración en todos los demás tratamientos.

**Cuadro 2: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de inicio (0 a 10 días)**

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5
Maíz	58.22	58.15	58.22	58.22	58.22
Torta de soya	34.11	34.11	34.11	34.11	34.11
Aceite de soya	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
Fosfato dicálcico	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71
Carbonato de calcio	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
Sal común	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
DL-Metionina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
HCl Lisina	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Bicarbonato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Premezcla*	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cloruro de Colina 60%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Secuestrante	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antioxidante	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Treonina-L	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Anticoccidial (Salinocarb)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
APC (Performance T25)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Probiótico (Calsporin)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Fórmula Probiótica II	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>
<b>Composición nutricional (calculado)</b>					
EM Mcal/Kg	2,975	2,975	2,975	2,975	2,975
Grasa cruda,%	6.124	6.124	6.124	6.124	6.124
Proteína cruda,%	21.500	21.500	21.500	21.500	21.500
Calcio,%	0.900	0.900	0.900	0.900	0.900
Fosforo disponible,%	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450
Sodio,%	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Lisina digestible,%	1.220	1.220	1.220	1.220	1.220
Metionina digestible,%	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605
Met+Cis digestible,%	0.910	0.910	0.910	0.910	0.910
Treonina digestible,%	0.830	0.830	0.830	0.830	0.830
Triptófano digestible,%	0.223	0.223	0.223	0.223	0.223
Valina digestible,%	0.906	0.906	0.906	0.906	0.906

\* Contenido por Kg de producto: Vit. A: 12 000 000 UI; Vit. D3: 5 000 000 UI; Vit. E: 30 000 UI; Vit. K3: 3 g; Tiamina: 2 g; Riboflavina: 10 g; Piridoxina: 3 g; Vit. B12: 0.015 g; Ácido fólico: 2 g; Niacina: 30 g; Ácido pantoténico: 11 g; Biotina: 0.15 g; Zinc: 80 g; Hierro: 50 g; Manganeso: 80 g; Cobre: 12 g; Yodo: 1 g; Selenio: 0.30. APC=Antibiótico promotor de crecimiento.

**Cuadro 3: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de crecimiento (11 a 28 días)**

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5
Maíz	61.66	61.59	61.66	61.66	61.66
Torta de soya	30.79	30.79	30.79	30.79	30.79
Aceite de soya	3.61	3.61	3.61	3.61	3.61
Fosfato dicálcico	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58
Carbonato de calcio	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
Sal común	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
DL-Metionina	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
HCl Lisina	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
Bicarbonato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Premezcla*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cloruro de Colina 60%	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Secuestrante	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antioxidante	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Treonina-L	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Anticoccidial (Salinocarb)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
APC (Performance T25)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
Probiótico (Calsporin)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Fórmula Probiótica II	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>
<b>Composición nutricional (calculado)</b>					
EM Mcal/Kg	3,025	3,025	3,025	3,025	3,025
Grasa cruda,%	6.374	6.374	6.374	6.374	6.374
Proteína cruda,%	20.158	20.158	20.158	20.158	20.158
Calcio,%	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840
Fosforo disponible,%	0.420	0.420	0.420	0.420	0.420
Sodio,%	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Lisina digestible,%	1.120	1.120	1.120	1.120	1.120
Metionina digestible,%	0.559	0.559	0.559	0.559	0.559
Met+Cis digestible,%	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850
Treonina digestible,%	0.730	0.730	0.730	0.730	0.730
Triptófano digestible,%	0.206	0.206	0.206	0.206	0.206
Valina digestible,%	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850

\* Contenido por Kg de producto: Vit. A: 12 000 000 UI; Vit. D3: 5 000 000 UI; Vit. E: 30 000 UI; Vit. K3: 3 g; Tiamina: 2 g; Riboflavina: 10 g; Piridoxina: 3 g; Vit. B12: 0.015 g; Ácido fólico: 2 g; Niacina: 30 g; Ácido pantoténico: 11 g; Biotina: 0.15 g; Zinc: 80 g; Hierro: 50 g; Manganeso: 80 g; Cobre: 12 g; Yodo: 1 g; Selenio: 0.30. APC=Antibiótico promotor de crecimiento.

### **3.2.7. Parámetros productivos**

#### **3.2.7.1. Peso vivo**

Las aves (400 pollos) fueron pesadas el día de la recepción, considerado como peso inicial (día 0) y los pesos siguientes, al final de cada semana (7, 14, 21 y 28 días) durante todo el período experimental. El pesaje se realizó por cada unidad experimental, utilizando una balanza eléctrica con capacidad para 6 kg y una sensibilidad de 0.5g; los datos fueron utilizados para obtener los pesos promedio de cada pollo por repetición en cada tratamiento, siendo estos los datos utilizados para el análisis estadístico.

#### **3.2.7.2. Ganancia de peso**

La ganancia de peso acumulada fue determinada a partir de los registros semanales de peso, mediante la diferencia de los pesos finales obtenidos cada semana y el pesaje inicial (día 0, llegada de las aves).

$$\text{Ganancia de peso acumulada (g/pollo/semana)} = \text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial(g)}$$

#### **3.2.7.3. Consumo de alimento**

El alimento se suministró de forma diaria a voluntad, siendo pesado y registrado el alimento ofrecido a cada repetición por tratamiento, así como, el saldo de alimento al final de cada semana. Se evaluó el consumo de alimento acumulado mediante la diferencia entre la cantidad total de alimento suministrado y el residuo al finalizar la semana; para luego determinar el consumo de alimento promedio por ave.

$$\text{Consumo de alimento (g)} = \text{Alimento suministrado (g)} - \text{Alimento rechazado (g)}$$

$$\text{Consumo alimento (g/pollo/semana)} = \frac{\text{Consumo de alimento (g)}}{\text{Número de pollos}}$$

El consumo de alimento fue ajustado por la mortalidad en cada repetición y tratamiento.

#### **3.2.7.4. Índice de conversión alimenticia**

La conversión alimenticia se calculó mediante la relación entre consumo de alimento y ganancia de peso vivo acumulada.

$$\text{Índice de conversión alimenticia} = \frac{\text{Consumo acumulado de alimento (g)}}{\text{Incremento acumulado de peso (g)}}$$

#### **3.2.7.5. Mortalidad**

Se calculó la mortalidad en base al número de aves muertas durante cada semana en cada tratamiento con respecto al número de aves al inicio de la semana y al número total de aves muertas en cada tratamiento, respectivamente.

$$\text{Mortalidad acumulada (\%)} = \frac{\text{Número de aves muertas} * 100}{\text{Número total de aves}}$$

#### **3.2.7.6. Índice de Eficiencia Productivo Europeo**

El índice de eficiencia productivo europeo sugerida por Griffin (1979), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Eficiencia Productivo Europeo} = \frac{(100\% - \text{Mortalidad acumulada (\%)})*\text{Peso vivo (kg)}*100}{\text{Conversión alimenticia}*\text{Edad(días)}}$$

#### **3.2.8. Peso relativo de órganos**

A los 21 y 28 días de edad, de forma aleatoria se sacrificó un pollo por cada repetición (ocho pollos por tratamiento) por la técnica de dislocación cervical (AVMA 2001). De cada ave se tomó el paquete visceral, del que se registró solo el peso de los órganos más representativos (páncreas, hígado, peso de intestino). Adicionalmente se alineó el intestino totalmente sobre una superficie plana y sin aplicar fuerza o tensión se midió el largo; para la medición del largo del intestino se consideró su extensión desde la unión con la molleja hasta 1 cm antes de llegar a la unión ileocecal.

Para el pesaje se empleó una balanza analítica con precisión de 0.01 g; los pesos de los órganos fueron convertidos a porcentaje de peso vivo por medio de la fórmula utilizada por Chávez *et al.* (2016). La longitud del intestino, fue convertido al porcentaje de peso vivo.

$$\text{Porcentaje de peso vivo} = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano} * 100}{\text{Peso de ave}}$$

### 3.2.9. Inmunocompetencia

Medido a través del índice morfométrico y la relación bursa/bazo. Se determinó los índices morfométricas del timo, bazo y bursa, empleando la fórmula utilizada por Vásquez (2016) que se presenta a continuación:

- ndice morfométrico = [Peso rgano (g)] / [Peso corporal (g)] x 1000
- Relación bursa/bazo = Peso bursa (g) / Peso bazo (g)

Se registró el peso corporal y se sacrificó dos aves por unidad experimental a los 21 y 28 días de edad. La fórmula para el índice morfométrico de órganos linfáticos propuesta difiere con el peso relativo de órganos digestivos en la multiplicación por 1000 debido a sus valores bajos.

### 3.2.10. Integridad intestinal

#### 3.2.10.1. Evaluación macroscópica

Para la evaluación de la integridad intestinal en los animales sacrificados, se procedió a colocar el intestino en una superficie plana, con la ayuda de una pinza y tijera se abrió el intestino. La apariencia macroscópica del intestino se evaluó mediante el sistema de puntuación De Gussem (2010), donde se consideró en valorar solo seis parámetros clínicos: pasaje de alimento, descamación celular, exceso de moco, exceso de fluido intestinal, hiperemia intestinal y gases intestinales con una puntuación binaria si está ausente (valor de 0) o presente (valor de 1).

Se evaluó también el score de lesiones para patógenos intestinales, según el grado de lesión intestinal por especies de *Eimerias* presentes en pollos (*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*) se evaluó de acuerdo con el sistema de puntuación descrito por Johnson y Reid (1970); en este método la severidad de las lesiones se califica en una escala que fluctúa desde 0 (sin lesiones aparentes en la mucosa del intestino) a 4 (máximo nivel de severidad).



Las lesiones para enteritis necrótica por *Clostridium perfringens* fue evaluado de acuerdo con lo descrito por Shojadoost *et al.* (2012), que indica un score que va desde 0 a 6 de acuerdo a la medición, siendo 0 sin lesiones aparentes y 6 el máximo nivel de lesión.

### **3.2.10.2. Evaluación microscópica: Histomorfometría intestinal**

Para las mediciones histomorfométricas se colectaron muestras del intestino delgado en cada ave tomada como muestra por repetición en las fechas de necropsia programada, 21 y 28 días de edad. Las muestras fueron dos segmentos de 2 cm de las porciones tanto del duodeno como del yeyuno por cada ave.

Las muestras fueron lavadas con agua destilada para eliminar contenido, guardadas en frascos estériles con formol al 10 por ciento debidamente rotulados. Posteriormente las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, para su procesamiento histológico consistente en inclusión en parafina y los cortes coloreados con hematoxilina-eosina. De cada segmento intestinal se realizaron un mínimo de 20 mediciones para determinar la longitud y ancho de las vellosidades, y la profundidad de las criptas de Lieberkuhn. Para obtener las mediciones se empleó un microscopio óptico de campo claro a 4X (Leica ICC50 W) y el programa LAS-EZ, las medidas se obtuvieron en micras ( $\mu$ ). Las mediciones histológicas en las láminas se hicieron siguiendo una adaptación del protocolo utilizado por Batista de Olivera *et al.* (2000). Las mediciones histomorfométricas intestinales son las siguientes:

#### **a. Altura de vellosidad**

Se seleccionaron vellosidades integrales y perpendiculares a la pared intestinal. Y se consideró el promedio de las alturas de vellosidades de cada tratamiento.

#### **b. Ancho de la vellosidad**

El ancho de las vellosidades intestinales se halló promediando el ancho apical, medio y base de las vellosidades.

**c. Profundidad de cripta**

Se midieron las profundidades de las criptas comprendidas entre las vellosidades seleccionadas para la medición de la altura de vellosidad, en cada lámina histológica. El promedio de la profundidad de cripta de las láminas histológicas fue el promedio de la profundidad de cripta de cada tratamiento.

**d. Relación entre altura de vellosidades y profundidad de cripta**

Esta relación resultó de la división del promedio de la altura de vellosidad y el promedio de la profundidad de cripta de cada lámina histológica por unidad experimental.

$$\text{Relación} = \frac{\text{Altura de vellosidad intestinal}}{\text{Profundidad de cripta intestinal}}$$

**3.2.11. Análisis estadístico**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con cinco tratamientos y ocho repeticiones para cada tratamiento, un total de 40 unidades experimentales (jaulas) con diez pollitos cada uno. El modelo lineal utilizado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta del efecto observado correspondiente a la j-ésima repetición en la que se probó el i-ésimo tratamiento.

$\mu$  = Efecto de la media general

$T_i$  = Efecto de i-ésimo tratamiento

$\epsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

La prueba de comparación de medias para los indicadores de producción, peso relativo de órganos, inmunocompetencia e histomorfometría intestinal se realizó a través de la prueba de Duncan; mientras, los indicadores para la evaluación macroscópica de la integridad intestinal se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis por ser variables no paramétricas. El software utilizado fue Rstudio para el análisis estadístico respectivo.

### **3.3. ESTUDIO II – DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA LA INCLUSIÓN DE LA FÓRMULA PROBIÓTICA DE ACTINOMICETOS**

#### **3.3.1. Animales experimentales**

Para la determinación de la concentración óptima para la inclusión del probiótico a base actinomicetos se utilizaron 768 pollos BB de la línea genética Cobb 500 de un día de edad, los cuales fueron distribuidos en seis tratamientos con ocho repeticiones y 16 pollos por repetición. Dichas unidades experimentales fueron distribuidas en un galpón por 42 días.

#### **3.3.2. Instalaciones**

Los pollos BB se alojaron en 48 corrales divididos con mallas plásticas soportadas en tubos, cada uno con dimensiones de 1.5 m x 1 metro con piso cubierto de viruta. Dentro de la primera semana, cada unidad experimental (corral) contó con comederos bandeja y bebederos tonguito; los cuales fueron reemplazados por comederos tipo tolva y bebederos automáticos de campana.

La iluminación y temperatura se controló según especificaciones del manual de la línea, pero sobretodo el comportamiento de las aves fue fundamental; para ello se utilizó los termohigrómetros. Asimismo, se contó con cuatro campanas criadoras a gas de dos tipos grandes circulares y pequeñas rectangulares.

Previo al inicio de la crianza, se creó un microclima a base de clavos, alambres y costales que fueron ubicados en el techo, alrededor del galpón (doble capa) tanto por dentro como por fuera para mantener la temperatura ideal; estos fueron retirándose posteriormente según la edad de los pollos. Finalizado el armado, previo a la recepción de los pollos BB, se realizó la desinfección de los utensilios y del ambiente completo.

### **3.3.3. Materiales y equipos**

Los materiales y equipos que se utilizaron para la crianza y obtención de datos fueron los siguientes:

- Cortinas tipo manta
- Malla plásticas
- Tubos de plástico
- Viruta
- Bebederos tipo tonguitos
- Bebederos automáticos tipo campana
- Comederos bandeja
- Comederos tipo tolva
- Campanas criadoras a gas
- Viruta
- Rastrillo
- Pala
- Jabas
- Bolsas negras plásticas
- Una balanza digital
- Termohigrómetro digital
- Cámara fotográfica
- Materiales de limpieza (escoba, tacho, recogedor, detergentes, manguera, baldes)
- Hojas de registro y materiales de escritorio

### **3.3.4. Producto a evaluar**

Para determinar la concentración óptima del probiótico a base de actinomicetos, se utilizó la formula probiótica I, que obtuvo mejores resultados en el primer estudio. Las concentraciones propuestas fueron: I-C1,  $10^4 - 10^5$  UFC/g; I-C2,  $10^8 - 10^{10}$  UFC/g y I-C3,  $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g. Las tres concentraciones de la Fórmula Probiótica I fueron añadidas al alimento durante la preparación, cuya dosis fue de 100 g/TM del alimento balanceado.

Asimismo, se administró Performance T25 (Tilosina fosfato) en dosis de 200 g/TM de alimento balanceado como antibiótico promotor de crecimiento (APC); por otro lado, también se usó Calsporin® como probiótico comercial, el cual contiene  $1 \times 10^{10}$  UFC/g de una cepa de *Bacillus subtilis* C-3102 en dosis de 100 g/TM de alimento balanceado. Ambos productos fueron también utilizados en el primer estudio.

La administración de estos productos se realizó durante la preparación del alimento, por tanto, su presencia y suministro fue durante todo el estudio del experimento; sin embargo, se respetó el tiempo de retiro del APC y anticoccidial, por lo que no fueron añadidos en la etapa de acabado (35-42 días).

### 3.3.5. Tratamientos

Los tratamientos se establecieron de acuerdo a la inclusión del antibiótico promotor de crecimiento (APC), probiótico comercial y distintas concentraciones (unidades formadoras de colonias, UFC) de la Fórmula Probiótica I (Cuadro 4).

**Cuadro 4: Dosis (g/TM) y concentración (UFC/g) de los productos incluidos en el alimento según el tratamiento**

Tratamientos	Dosis de producto (g/TM)
T1 Dieta control	-
T2 Dieta con APC	Tilosina 200
T3 Dieta con probiótico comercial	100
T4 Dieta con Fórmula Probiótica I (I-C1)	100
T5 Dieta con Fórmula Probiótica I (I-C2)	100
T6 Dieta con Fórmula Probiótica I (I-C3)	100

*Nota:* APC= Antibiótico promotor de crecimiento, g/TM = gramos por tonelada métrica, UFC/g = unidades formadoras de colonias por gramo, I-C1=concentración baja ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), I-C2=concentración media ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), I-C3=concentración alta ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g)

### **3.3.6. Dietas experimentales**

La elaboración de las dietas experimentales se realizó en la Planta de Alimentos del Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos (PIPSA), Facultad de Zootecnia de la UNALM. Las formulaciones de las dietas se realizaron utilizando el software DAPP, considerando las especificaciones nutricionales del manual de la Línea Cobb 500 (Cobb-Vantress 2018).

El programa de alimentación se elaboró para tres fases: inicio para la etapa de 0 a 14 días, crecimiento para la etapa de 15 a 35 días y acabado para la etapa de 36 a 42 días. La dieta se formuló usando insumos convencionales; las composiciones porcentuales y su valor nutricional de las dietas experimentales para las etapas de inicio, crecimiento y acabado se presentan en el Cuadro 5, Cuadro 6 y Cuadro 7, respectivamente. La presentación física del alimento en la experimentación fue en harina.

Se añadió un anticoccidial, Salinocarb (Salinomicina Sódica y Nicarbazina) en dosis de 500 g/TM de alimento balanceado. Este solamente fue administrado en el tratamiento dos (T2) en las etapas de inicio y crecimiento, debido a que presentan una acción antibiótica, pese a que su accionar principal es contra coccidios. Por tanto, con el fin de evitar alguna alteración en los resultados con los productos a evaluar se evitó su administración en todos los demás tratamientos.

**Cuadro 5: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de inicio (0 a 14 días)**

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Maíz nacional	58.22	58.15	58.22	58.22	58.22	58.22
Torta de soya	34.11	34.11	34.11	34.11	34.11	34.11
Aceite crudo de soya	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
Fosfato dicálcico	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71
Carbonato de calcio	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
Sal común	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
DL-Metionina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
HCl Lisina	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Bicarbonato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Premezcla*	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cloruro de Colina 60%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Secuestrante	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antioxidante	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Treonina-L	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Anticoccidial (Salinocarb)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
APC (Performance T25)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Probiótico (Calsporin)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I-C1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I-C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Fórmula Probiótica I-C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>
<b>Composición nutricional (calculado)</b>						
EM Mcal/Kg	2,975	2,975	2,975	2,975	2,975	2,975
Grasa cruda,%	6.124	6.124	6.124	6.124	6.124	6.124
Proteína cruda,%	21.500	21.500	21.500	21.500	21.500	21.500
Calcio,%	0.900	0.900	0.900	0.900	0.900	0.900
Fosforo disponible,%	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450
Sodio,%	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Lisina digestible,%	1.220	1.220	1.220	1.220	1.220	1.220
Metionina digestible,%	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605	0.605
Met+Cis digestible,%	0.910	0.910	0.910	0.910	0.910	0.910
Treonina digestible,%	0.830	0.830	0.830	0.830	0.830	0.830
Triptófano digestible,%	0.223	0.223	0.223	0.223	0.223	0.223
Valina digestible,%	0.906	0.906	0.906	0.906	0.906	0.906

\* Contenido por Kg de producto: Vit. A: 12 000 000 UI; Vit. D3: 5 000 000 UI; Vit. E: 30 000 UI; Vit. K3: 3 g; Tiamina: 2 g; Riboflavina: 10 g; Piridoxina: 3 g; Vit. B12: 0.015 g; Ácido fólico: 2 g; Niacina: 30 g; Ácido pantoténico: 11 g; Biotina: 0.15 g; Zinc: 80 g; Hierro: 50 g; Manganeso: 80 g; Cobre: 12 g; Yodo: 1 g; Selenio: 0.30. APC=Antibiótico promotor de crecimiento.

I-C1 = concentración baja ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), I-C2 = concentración media ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), I-C3 = concentración alta ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g)

**Cuadro 6: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de crecimiento (15 a 35 días)**

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Maíz nacional	61.33	61.26	61.33	61.33	61.33	61.33
Torta de soya	30.79	30.79	30.79	30.79	30.79	30.79
Aceite crudo de soya	4	4	4	4	4	4
Fosfato dicálcico	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58	1.58
Carbonato de calcio	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Sal común	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
DL-Metionina	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
HCl Lisina	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Bicarbonato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Premezcla*	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cloruro de Colina 60%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Secuestrante	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antioxidante	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Treonina-L	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Anticoccidial (Salinocarb)	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
APC (Performance T25)	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Probiótico comercial(Calsporin)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I-C1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I-C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Fórmula Probiótica I-C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>
<b>Composición nutricional (calculado)</b>						
EM Mcal/Kg	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050
Grasa cruda,%	6.980	6.980	6.980	6.980	6.980	6.980
Proteína cruda,%	20.240	20.240	20.240	20.240	20.240	20.240
Calcio,%	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850
Fosforo disponible,%	0.420	0.420	0.420	0.420	0.420	0.420
Sodio,%	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180
Lisina digestible,%	1.120	1.120	1.120	1.120	1.120	1.120
Metionina digestible,%	0.560	0.560	0.560	0.560	0.560	0.560
Met+Cis digestible,%	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850
Treonina digestible,%	0.730	0.730	0.730	0.730	0.730	0.730
Triptófano digestible,%	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Valina digestible,%	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850	0.850

\* Contenido por Kg de producto: Vit. A: 12 000 000 UI; Vit. D3: 5 000 000 UI; Vit. E: 30 000 UI; Vit. K3: 3 g; Tiamina: 2 g; Riboflavina: 10 g; Piridoxina: 3 g; Vit. B12: 0.015 g; Ácido fólico: 2 g; Niacina: 30 g; Ácido pantoténico: 11 g; Biotina: 0.15 g; Zinc: 80 g; Hierro: 50 g; Manganeso: 80 g; Cobre: 12 g; Yodo: 1 g; Selenio: 0.30. APC=Antibiótico promotor de crecimiento. I-C1 = concentración baja ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), I-C2 = concentración media ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), I-C3 = concentración alta ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g)



**Cuadro 7: Composición porcentual de ingredientes y composición nutricional de las dietas experimentales empleadas en la etapa de acabado (36-42 días)**

Ingredientes (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Maíz nacional	67.40	67.40	67.40	67.40	67.40	67.40
Torta de soya	24.68	24.68	24.68	24.68	24.68	24.68
Aceite crudo de soya	4.29	4.29	4.29	4.29	4.29	4.29
Fosfato dicálcico	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Carbonato de calcio	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
Sal común	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
DL-Metionina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
HCl Lisina	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
Bicarbonato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Premezcla*	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cloruro de Colina 60%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Secuestrante	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Antioxidante	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Treonina-L	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Probiótico comercial (Calsporin)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I-C1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Fórmula Probiótica I-C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Fórmula Probiótica I-C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
<b>Total</b>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
<b>Composición nutricional (calculado)</b>						
EM Mcal/Kg	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150
Grasa cruda,%	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270
Proteína cruda,%	17.790	17.790	17.790	17.790	17.790	17.790
Calcio,%	0.760	0.760	0.760	0.760	0.760	0.760
Fosforo disponible,%	0.390	0.390	0.390	0.390	0.390	0.390
Sodio,%	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180
Lisina digestible,%	0.970	0.970	0.970	0.970	0.970	0.970
Metionina digestible,%	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520
Met+Cis digestible,%	0.780	0.780	0.780	0.780	0.780	0.780
Treonina digestible,%	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630	0.630
Triptófano digestible,%	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170
Valina digestible,%	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750

\* Contenido por Kg de producto: Vit. A: 12 000 000 UI; Vit. D3: 5 000 000 UI; Vit. E: 30 000 UI; Vit. K3: 3 g; Tiamina: 2 g; Riboflavina: 10 g; Piridoxina: 3 g; Vit. B12: 0.015 g; Ácido fólico: 2 g; Niacina: 30 g; Ácido pantoténico: 11 g; Biotina: 0.15 g; Zinc: 80 g; Hierro: 50 g; Manganeso: 80 g; Cobre: 12 g; Yodo: 1 g; Selenio: 0.30. APC=Antibiótico promotor de crecimiento.

I-C1 = concentración baja ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), I-C2 = concentración media ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), I-C3 = concentración alta ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g)

### **3.3.7. Parámetros productivos**

#### **3.3.7.1. Peso vivo**

Las aves (756 pollos) fueron pesadas el día de la recepción, considerado como peso inicial (día 0) y los pesos siguientes, al final de cada semana durante todo el período experimental. El pesaje se realizó por cada unidad experimental, utilizando una balanza eléctrica; los datos fueron utilizados para obtener los pesos promedio de cada pollo por repetición en cada tratamiento, siendo estos los datos utilizados para el análisis estadístico.

#### **3.3.7.2. Ganancia de peso**

La ganancia de peso fue determinada a partir de los registros semanales de peso, mediante la diferencia de los pesos entre semanas; la ganancia de peso acumulada se obtuvo mediante la diferencia del último pesaje y pesaje inicial (día 0, llegada de las aves).

$$\text{Ganancia de peso acumulada (g/pollo/semana)} = \text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial(g)}$$

#### **3.3.7.3. Consumo de alimento**

El alimento se suministró de forma diaria a voluntad, siendo pesado y registrado el alimento ofrecido a cada repetición por tratamiento, así como el saldo de alimento al final de cada semana. Se evaluó el consumo de alimento acumulado mediante la diferencia entre la cantidad total de alimento suministrado y el residuo al finalizar la semana; para luego determinar el consumo de alimento promedio por ave.

$$\text{Consumo de alimento (g)} = \text{Alimento suministrado (g)} - \text{Alimento rechazado (g)}$$

$$\text{Consumo alimento (g/pollo/semana)} = \frac{\text{Consumo de alimento semanal (g)}}{\text{Número de pollos}}$$

El consumo de alimento fue ajustado por la mortalidad, si fuere el caso, en la respectiva repetición y tratamiento.

#### **3.3.7.4. Índice de conversión alimenticia**

La conversión alimenticia se calculó mediante la relación entre consumo de alimento y ganancia de peso vivo acumulada.

$$\text{Índice de conversión alimenticia} = \frac{\text{Consumo acumulado de alimento (g)}}{\text{Incremento acumulado de peso (g)}}$$

### 3.3.7.5. Mortalidad

Se calculó la mortalidad en base al número de aves muertas y descartadas durante cada semana en cada tratamiento con respecto al número de aves al inicio de la semana y al número total de aves muertas en cada tratamiento, respectivamente. Asimismo, se realizó la necropsia a todo animal que murió durante el estudio para determinar las causas de mortalidad.

$$\text{Mortalidad acumulada (\%)} = \frac{\text{Número de aves muertas} * 100}{\text{Número total de aves}}$$

### 3.3.7.6. Índice de eficiencia productivo europeo

El índice de eficiencia productivo europeo se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{Índice de eficiencia productivo europeo} = \frac{(100\% - \text{Mortalidad acumulada (\%)}) * \text{Peso vivo (kg)} * 100}{\text{Conversión alimenticia} * \text{Edad (días)}}$$

### 3.3.8. Peso relativo de órganos

A los 21 y 42 días de edad, de forma aleatoria se sacrificó un pollo por cada repetición (ocho pollos por tratamiento) por la técnica de dislocación cervical (AVMA 2001). De cada ave se tomó el paquete visceral, se registró el peso de los órganos digestivos más representativos (páncreas, hígado, peso de intestino). Adicionalmente se hizo la medición del largo del intestino para lo cual se consideró su extensión desde la unión con la molleja hasta 1 cm antes de llegar a la unión ileocecal.

Para el pesaje se empleó una balanza analítica con precisión de 0.01 g; los pesos de los órganos fueron convertidos a porcentaje de peso vivo por medio de la fórmula utilizada por Chávez *et al.* (2016). La longitud del intestino fue convertido al porcentaje de peso vivo, para su registro, se alinearon totalmente sobre una superficie plana y, sin aplicar fuerza o tensión, se midió el largo.

$$\text{Porcentaje de peso vivo} = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano} * 100}{\text{Peso de ave}}$$

### **3.3.9. Inmunocompetencia**

Medido a través del índice morfométrico de órganos linfoides y la relación bursa/bazo. Se determinó los índices morfométricas del timo, bazo y bursa, empleando la fórmula utilizada por Vásquez (2016) que se presenta a continuación:

- ndice morfométrico =  $[\text{Peso \acute{o}rgano (g)}] / [\text{Peso corporal (g)}] \times 1000$
- Relación bursa/bazo =  $\text{Peso bursa (g)} / \text{Peso bazo (g)}$

Se registró el peso corporal y se sacrificó dos aves por unidad experimental a los 21 y 42 días de edad.

### **3.3.10. Integridad intestinal**

#### **3.3.10.1. Evaluación macroscópica**

Para la evaluación de la integridad intestinal en los animales sacrificados, se procedió a colocar el intestino en una superficie plana, con la ayuda de una pinza y tijera se abrió el intestino. Se registró el pasaje de alimento, descamación celular, exceso de moco, exceso de fluido intestinal, hiperemia intestinal y gases intestinales; cada uno de estos indicadores se evaluarán considerando si está ausente (valor de 0) o presente (valor de 1).

Se evaluó también el score de lesiones para patógenos intestinales, según el grado de lesión intestinal por especies de *Eimerias* presentes en pollos (*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*) se evaluó de acuerdo con el sistema de puntuación descrito por Johnson y Reid (1970); en este método la severidad de las lesiones se califica en una escala que fluctúa desde 0 (sin lesiones aparentes en la mucosa del intestino) a 4 (máximo nivel de severidad).

Las lesiones para enteritis necrótica por *Clostridium perfringens* fue evaluado de acuerdo con lo descrito por Shojadoost *et al.* (2012), que indica un score que va desde 0 a 6 de acuerdo a la medición, siendo 0 sin lesiones aparentes y 6 el máximo nivel de lesión.

### **3.3.10.2. Evaluación microscópica: Histomorfometría intestinal**

Para las mediciones histomorfométricas se colectaron muestras del intestino delgado en cada ave tomada como muestra por repetición en las fechas de necropsia programada, 21 y 28 días de edad. Las muestras fueron dos segmentos de 2 cm de las porciones tanto del duodeno como del yeyuno por cada ave. Las muestras fueron lavadas con agua destilada para eliminar contenido, guardadas en frascos estériles con formol al 10 por ciento debidamente rotulados. Posteriormente las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, para su procesamiento histológico consistente en inclusión en parafina y los cortes coloreados con hematoxilina-eosina. De cada segmento intestinal se realizaron un mínimo de 20 mediciones para determinar la longitud y ancho de las vellosidades, y la profundidad de las criptas de Lieberkuhn. Para obtener las mediciones se empleó un microscopio óptico de campo claro a 4X (Leica ICC50 W) y el programa LAS-EZ, las medidas se obtuvieron en micras ( $\mu$ ). Las mediciones histológicas en las láminas se hicieron siguiendo una adaptación del protocolo utilizado por Batista de Olivera *et al.* (2000). Las mediciones histomorfométricas intestinales son las siguientes:

#### **e. Altura de vellosidad**

Se seleccionaron vellosidades integrales y perpendiculares a la pared intestinal. Y se consideró el promedio de las alturas de vellosidades de cada tratamiento.

#### **f. Ancho de la vellosidad**

El ancho de las vellosidades intestinales se halló promediando el ancho apical, medio y base de las vellosidades.

#### **g. Profundidad de cripta**

Se midieron las profundidades de las criptas comprendidas entre las vellosidades seleccionadas para la medición de la altura de vellosidad, en cada lámina histológica. El promedio de la profundidad de cripta de las láminas histológicas fue el promedio de la profundidad de cripta de cada tratamiento.

#### **h. Relación entre altura de vellosidades y profundidad de cripta**

Esta relación resultó de la división del promedio de la altura de vellosidad y el promedio de la profundidad de cripta de cada lámina histológica por unidad experimental.

$$\text{Relación} = \frac{\text{Altura de vellosidad intestinal}}{\text{Profundidad de cripta intestinal}}$$

#### **3.3.11. Análisis estadístico**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con seis tratamientos y ocho repeticiones para cada tratamiento, un total de 48 unidades experimentales con 16 pollitos cada uno. El modelo lineal utilizado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta del efecto observado correspondiente a la j-ésima repetición en la que se probó el i-ésimo tratamiento.

$\mu$  = Efecto de la media general

$T_i$  = Efecto de i-ésimo tratamiento

$\epsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

La prueba de comparación de medias para los indicadores de producción, peso relativo de órganos, inmunocompetencia e histomorfometría intestinal se realizó a través de la prueba de Duncan; mientras, los indicadores para la evaluación macroscópica de la integridad intestinal se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis por ser variables no paramétricas. El software utilizado fue Rstudio para el análisis estadístico respectivo con un nivel de significancia del 5 %.

### **3.4. ESTUDIO III – CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS**

#### **3.4.1. Equipos y materiales**

Los equipos y materiales que se utilizaron en el laboratorio para la identificación molecular de cepas fueron los siguientes:

- Termociclador T100<sup>TM</sup>(BioRad)
- Microcentrífuga (Centurion)
- Sistema de electroforesis horizontal runVIEW<sup>TM</sup> (Clever Scientific)
- Nano Drop One (Thermo Scientific)
- Enzimas (Lizosima, Proteinasa K, Taq DNA polimerasa)
- Cloroformo
- Set buffer (Tris Base, EDTA, cloruro de sodio)
- SDS
- Tubos de 0.2 ml
- Agarosa
- TAE
- Densificante (Buffer de carga)
- Kit de purificación de ADN (SpinPrep<sup>TM</sup>)
- DNTPs
- pA 0.05
- pH 0.05
- Marcador PCR
- Cinta indicadora
- Agar Cerebro Corazón
- Tubo p/ centrífuga, tapa rosca 15 ml □ Matraces Erlenmeyer 250 ml.
- Matraces Erlenmeyer 1000 ml
- Eppendorf
- Micropipetas

#### **3.4.2. Extracción del ADN cromosómico total**

Las cepas de los actinomicetos seleccionados por su actividad probiótica, fueron inoculados en matraces con 30 ml de medio TSB para favorecer el crecimiento de las cepas. Se incubaron a 30 °C por 48 horas a 250 rpm, y se añadió dentro del matraz esferas de vidrio

para evitar la aglomeración de micelios producidos por los actinomicetos. El protocolo para la extracción se desarrolló de acuerdo a Kieser *et al.* (2000). Para lo cual los cultivos fueron centrifugados en tubos eppendorf a 13000 rpm por 5 minutos, dos a tres veces. Al retirarlos se decantó, quedando el pellet, el cual fue suspendido en 150 µl con SET BUFFER, compuesto de 1M Tris-HCl a un pH8, 0.5M EDTA a un pH8, 5M NaCl y H<sub>2</sub>O autoclavado. Para mezclar los pellets con el SET BUFFER se usó un agitador vortex. Se añadió a la mezcla 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se pasó a incubar a 37°C por 1 hora.

Después se le agregó 40 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló por inversión, y se añadió 40 µl de SDS al 10%, se mezcló nuevamente por inversión. Los tubos eppendorf se incubaron a 55 °C por 2 horas, invirtiéndolos cada 30 minutos. Al retirarlos, se añadió 100 µl de NaCl 5M, y fueron incubados a 37 °C por 30 minutos para después agregarle 500 µl de cloroformo, los cuales fueron mezclados y centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga (Centurión) a temperatura ambiente.

Posteriormente se pasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf con 700 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y la telilla suspendida se retiró con la ayuda de un tip de 1000 µl, a otro eppendorf que contenía 500 µl de etanol al 70 por ciento para ser lavado el ADN, y se dejó secar por 5 minutos. Finalmente, se cogió el ADN y se pasó a un eppendorf que contenía 100 µl de agua ultrapura estéril.

#### **3.4.2.1. Amplificación por PCR**

Para realizar la amplificación del ADNr 16S se utilizó las muestras de ADN cromosómico, primers universales (pA AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG y pH AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA), buffer, dNTPs, agua ultrapura y PCR enhacer. Se realizó la preparación del Master Mix (Cuadro 8).



**Cuadro 8. Componentes del Master Mix para una muestra**

Componentes	Concentración (µl)
ADN extraído 1:10	6
Buffer de PCR 10X + MgCl 50 mM	6.5
dNTPs 10 mM	1
Primer pA 10 µM	1
Primer pH 10 µM	1
PCR enhacer 10X	2.5
H <sub>2</sub> O estéril ultrapura	31
Volumen total	50

Se diluyó cada una de las muestras de ADN en 1:10, debido a su aspecto denso; se añadió el Master Mix y 1 µl de *Pfx* ADN polimerasa platinum (Invitrogen). Para la amplificación del ADN<sub>r</sub> 16S se realizó mediante PCR en un termociclador T100<sup>TM</sup> (BioRad). En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo en el que el DNA se sustituyó por agua estéril ultrapura.

La reacción de amplificación comienza con una fase inicial de desnaturalización (95°C, durante 10 minutos), seguida de 32 ciclos compuestos de pasos sucesivos de (94° C, durante 0.5 minuto), la unión de iniciadores o cebadores (57.4° C, durante 1 minuto) y la elongación (72° C, durante 1 minuto). Por último, se produce un ciclo final de extensión (72° C, durante 10 minutos).

#### **3.4.2.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

La electroforesis en geles de agarosa se realizó en cubetas horizontales a una corriente de 100 V, utilizando como electrolito el tampón TAE (1x) (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA). La concentración de agarosa de los geles fue de 1 por ciento. Para facilitar la visualización de los fragmentos del ADN tras la electroforesis, se utilizó Nancy-520, es una tinción fluorescente para ADN, el cual fue añadido cuando aún el gel era líquido en una proporción de 1:5000 al volumen total de la solución de agarosa.

Las muestras de ADN amplificadas se mezclaron con azul de bromofenol 5x (100 mM de EDTA, 43% glicerol y 0,5% azul de bromofenol), que actúa como densificante y marcador. Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del fago Lambda digerido *Pst*I. Finalmente, las bandas de ADN se observaron en un transiluminador con luz UV.

Cabe señalar, que se comprobó la cantidad y calidad de las muestras, previamente a la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando un sistema de electroforesis horizontal runVIEW™, conformado por un transiluminador, cámara de electroforesis y cámara con Zoom: 5x optical / 4x digital integrados.

#### **3.4.2.3. Purificación de ADN**

Finalizada la electroforesis, se recortó la agarosa que contiene los fragmentos de ADN de interés y se purificó el ADN utilizando el kit comercial SpinPrep™ Gel DNA Kit (Novagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se procedió a cuantificar el ADN en un Nano Drop One (Thermo Scientific) debido a la concentración recomendada de 50 ng/ul por el Laboratorio de Macrogen Inc. (Seúl-Corea), quien realizó el servicio de secuenciación de las muestras.

#### **3.4.2.4. Secuenciación del ADNr 16S de los actinomicetos seleccionados**

Se amplificaron y secuenciaron las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas aisladas del contenido intestinal de gallinas criollas, las cuales fueron previamente seleccionadas por sus características probióticas en las crianzas realizadas.

Para la secuenciación se utilizó un secuenciador automático de ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems). Es un sistema de análisis basado en el marcado por fluorescencia de las moléculas de ADN y su posterior separación mediante electroforesis capilar. Las secuencias se analizaron mediante el programa BLAST SEARCH NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) que busca homologías al nivel de nucleótidos o de aminoácidos.

Posteriormente con ayuda del programa Bioedit y Sequence Scanner v1.0 de Applied Biosystems, se analizó comparativamente las secuencias, mediante la evaluación de los electroferogramas, con el fin de comprobar la lectura correcta de nucleótidos diferenciadores (posiciones nucleotídicas variables dentro del grupo y entre agrupamientos) permitiendo agruparlos y alinearlos a la hora de elaborar la genealogía molecular (árbol filogenético), corrigiendo así las posibles discrepancias para una correcta diferenciación en su relación evolutiva.

#### **3.4.2.5. Taxonomía molecular por alineamiento de secuencias y análisis filogenético**

Luego de la amplificación por PCR del gen ADNr 16S para cada una de las cepas seleccionadas, a través del análisis de sus secuencias se calculó finalmente los coeficientes de asociación y se realizó la construcción e interpretación del árbol filogenético en red como un primer análisis de su relación evolutiva con otros géneros y especies conocidos para ser usados como referencia evolutiva. Posteriormente, las secuencias entraron en un proceso de ordenamiento y análisis a detalle, editándolas, ordenándolas y alineando las posiciones nucleotídicas correctamente con secuencias patrón de especies del género referencial.

Usando el software BioEdit, se seleccionó la región de aproximadamente 451pb que corresponden a las regiones hipervariables V3-V4 (Cai *et al.* 2013), las cuales inician aproximadamente en la posición del nucleótido 260 al 710 de la secuencia del ADNr 16S, Posteriormente haciendo uso del paquete informático Clustal W, Gblocks\_0.91b, y el comando DNAPARS del Programa Phylip, se procedió a ordenar las secuencias y trabajarlas en el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) en el cual se terminó de construir la filogenia con un análisis de Máxima Parsimonia y bootstrap de 1000 repeticiones.

Los árboles filogenéticos obtenidos fueron posteriormente analizados e inferida su veracidad en la filogenia usando el método de Neighbor-joining (Saitou y Nei 1987). El árbol seleccionado, se comparará con los resultados de evaluación fenotípica tanto microscópica como bioquímica, de este modo, asegurar que las relaciones evolutivas entre las cepas, a través de los agrupamientos que se generen y los ancestros comunes que demarcan las distancias entre ellos, son congruentes.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. ESTUDIO I – DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LOS ACTINOMICETOS**

#### **4.1.1. Parámetros productivos**

El promedio para el peso vivo inicial, peso vivo final, ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad y eficiencia productiva europea de los pollos por efecto de la suplementación de probióticos hasta los 28 días de edad se resumen en el Cuadro 9. El peso vivo final y ganancia de peso fueron afectados significativamente ( $p < 0.05$ ) por la adición de las fórmulas probióticas propuestas a base de actinomicetos, siendo el grupo T4 (dieta con Fórmula Probiótica I) diferente y mayor respecto a los grupos T1 (dieta control), T3 (dieta con *Bacillus subtilis*) y T2 (dieta con APC).

El peso vivo inicial (día 0) es muy importante para poder comenzar el engorde de los pollos porque influye en los resultados finales; por tanto, se empezó con su evaluación de los pollos de carne, los cuales no se diferenciaron entre los tratamientos. Por otro lado, estos pesos superan el peso vivo promedio que indica el manual de la Línea Cobb 500 (Cobb - Vantress 2018).

El peso vivo final hasta los 28 días (final de la etapa de crianza), los grupos de aves alimentados con la dieta que contenía la Fórmula Probiótica I a base de actinomicetos (T4) obtuvo el mejor valor ( $p < 0.05$ ) con 1678.05 g, seguido de los que fueron alimentados con la Fórmula Probiótica II a base de actinomicetos (T5) con 1668.72 g, esto se observó desde los 21 días de edad; mientras, el menor valor obtenido fue con la dieta que contenía el antibiótico promotor de crecimiento (T2) con 1628.07 g.

**Cuadro 9: Comportamiento productivo en pollos de carne de la línea Cobb500 suplementados con probióticos (Período de 1 a 28 días de edad)**

Parámetros productivos	Tratamiento <sup>1</sup>				
	T1	T2	T3	T4	T5
Peso vivo inicial, g/ave	48.82 <sup>2</sup>	49.28	49.77	49.66	49.71
Peso vivo final, g/ave	1635.31 <sup>bc</sup>	1628.07 <sup>c</sup>	1641.03 <sup>bc</sup>	1678.05 <sup>a</sup>	1668.72 <sup>ab</sup>
Ganancia de peso, g/ave	1586.49 <sup>bc</sup>	1578.79 <sup>c</sup>	1591.26 <sup>bc</sup>	1628.39 <sup>a</sup>	1619.01 <sup>ab</sup>
Consumo de alimento, g/ave	2255.12	2288.11	2317.89	2275.28	2291.72
Conversión alimenticia, g/g	1.42	1.45	1.46	1.4	1.42
Mortalidad, %	2.5	1.25	1.25	2.5	0
Eficiencia productiva europea	400.37	396.54	398.71	418.64	421.18

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I, T5: dieta con Fórmula Probiótica II.

<sup>2</sup> Valores son el promedio de ocho repeticiones (diez aves por repetición) por tratamiento

<sup>a, b, c</sup> Valores dentro de una fila con superíndice no común difieren significativamente ( $p < 0.05$ ).

Resultados semejantes son reportados por Eckert *et al.* (2010), quienes demostraron que la administración de un probiótico a base de *Lactobacillus spp.* a través del agua de bebida y alimento incrementaba el peso en pollos tratados con respecto a los controles. Asimismo, Gutiérrez *et al.* (2015) mostraron diferencias estadísticas favorables para el peso vivo a los 15, 30 y 42 días, en pollos de la línea Ross que recibieron un suplemento de *Bacillus clausii*, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) y *Lactococcus lactis* en agua.

Por el contrario, otros autores, quienes al emplear diferentes cepas probióticas indistintamente al modo de administración no reportaron diferencias estadísticas favorables sobre el peso vivo a los 21 días de edad (Panda *et al.* 2000, Murry *et al.* 2006, Awad *et al.* 2009, Osorio *et al.* 2010, Abudabos *et al.* 2017). También, Martínez *et al.* (2019) quienes usaron la cepa *Streptomyces sp.* RL8 como probiótico en pollos de la raza Leghorn hasta los 21 días de edad, no ejerció efecto alguno sobre el peso vivo final.

Esta diferencia puede deberse a la variación de la supervivencia de las cepas utilizadas en los probióticos dentro del intestino de los pollos de carne y la tasa de dosis del probiótico utilizado (He *et al.* 2019).

Ante los efectos positivos mostrados, Cuevas *et al.* (2000) y Kalavathy *et al.* (2003) aducen que los probióticos pueden generar un efecto positivo sobre los pollos mejorando la absorción de nutrientes en la dieta suministrada. Además, Tang *et al.* (2014) indican que los pesos superiores que se obtienen al suministrar probióticos puede deberse a un posible aumento en la retención de proteína cruda suministrada en la dieta. Por tanto, el grupo T4 que recibió la Fórmula Probiótica I a base de actinomicetos demostró ser más eficaz que los otros aditivos, la Fórmula Probiótica II (T5) y del *Bacillus subtilis* (T3). Cabe señalar que las dosis utilizadas fueron iguales para los tres aditivos probióticos.

La ganancia de peso hasta los 28 días de edad se diferenció estadísticamente entre los tratamientos, indicando un valor superior para el T4 (Fórmula Probiótica I) seguido del T5 (Fórmula Probiótica II) con 1628.39 g/ave y 1619.01 g/ave, respectivamente. Esta mejora se observó desde los 21 días de edad. Mientras, la menor ganancia lo obtuvo el T2 (antibiótico promotor de crecimiento) con 1578.79 g/ave a los 28 días de edad.

De forma semejante, Srinivas *et al.* (2018) usando un probiótico comercial ( $2 \times 10^9$  cfu/g) a base de *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Aspergillus oryza* y *Candida pintolopesii* mostraron mejor resultado en la ganancia de peso respecto a las aves que se les adicionó el antibiótico promotor de crecimiento.

Algunos otros autores reportan similares resultados, adicionando 12 cepas de *Lactobacillus* (Kalavathy *et al.* 2003), *Enterococcus faecium* (Samli *et al.* 2007), *Lactobacillus bulgaricus* (Apata *et al.* 2008), *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Clostridium perfringens* (Song *et al.* 2014), la combinación de *Lactobacillus salivarius* y *Pediococcus parvulus* (Neveling y Dicks 2021) como probióticos generan un incremento significativo en la ganancia de peso respecto a los controles.

En contraste a los efectos por la adición de actinomicetos en este estudio, tenemos a Martínez *et al.* (2019) quienes usaron la cepa *Streptomyces* sp. RL8 como probiótico en aves de la raza Leghorn, hasta los 21 días de edad, sin mostrar resultados positivos con la ganancia de peso vivo. Cabe recalcar, que estos animales no se caracterizan por una elevada producción de carne sino en la producción de huevos.

La ganancia de peso es importante para los sistemas de producción dado que generan una mejor rentabilidad (Jones *et al.* 2018). Por tanto, el grupo T4 que recibió la Fórmula Probiótica I a base de actinomicetos demostró ser más eficaz en la ganancia de peso respecto a los otros aditivos probióticos, Fórmula Probiótica II (T5) y *Bacillus subtilis* (T3). Según Zhu *et al.* (2009) describieron que el grado de efecto de los probióticos depende de la especie, la cepa bacteriana, el método de aplicación, la edad del ave, las condiciones generales de higiene en la granja y los factores ambientales.

El consumo de alimento hasta los 28 días de edad no mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos; pasando desapercibida la adición de insumos promotores de crecimiento en la alimentación de los pollos en evaluación. Esto concuerda con Kazemi *et al.* (2019) quienes tampoco encontraron diferencias estadísticas sobre el consumo de alimento con la suplementación de dos consorcios diferentes de cepas probióticas (pertenecientes al género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, entre otros) respecto de los grupos controles, tratado con antibiótico y uno sin ningún aditivo. Del mismo modo, Arteaga *et al.* (2020), reportan que el consumo de alimento no fue

significativamente afectado por la adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* 20Bp y *Lactobacillus brevis* 40Lp. Varios otros estudios muestran que el consumo de alimento de los pollos no se ve afectada por la suplementación de cepas probióticas (Timmerman *et al.* 2006, Nayebpor *et al.* 2007, Kalavathy *et al.* 2009, Shokryazdan *et al.* 2017).

Mientras, Hosseini *et al.* (2013) indican que la adición de probióticos en la alimentación puede provocar una disminución en el consumo de alimento, debido al incremento de retención de nutrientes ya que las bacterias secretan enzimas que hidrolizan nutrientes energéticos que llevaría a reducir el consumo de alimento.

Por otro lado, otros estudios demuestran que la suplementación con probióticos a base de distintos microorganismos pueden incrementar el consumo de alimento, ya sea en algún periodo en particular o durante toda la evaluación (Denli *et al.* 2003, Sharma *et al.* 2012, Alkhalf *et al.* 2010). Sin embargo, en la presente investigación, la suplementación con probióticos a base de actinomicetos no generó ningún efecto sobre el consumo de alimento respecto de los grupos control; a pesar que el grupo T4 (dieta con Fórmula Probiótica I) obtuvo una mayor ganancia de peso a los 28 días de edad. Esto contrasta con Jha *et al.* (2020), quienes asocian comúnmente una mejor ganancia de peso corporal con una mayor ingesta de alimento y una mejor tasa de conversión alimenticia. Sin embargo, cabe señalar que no solo debemos basarnos en el aumento del consumo de alimento sino en la conversión alimenticia, para observar la mayor eficiencia en el uso y aprovechamiento de los nutrientes ingeridos.

En las aves, el consumo de alimento depende de varios factores, como principal factor tenemos a la temperatura ambiental, siendo el rango óptimo de 20 a 25°C (neutralidad térmica) para un mejor desempeño; temperaturas superiores, el consumo de alimento disminuye (Quishpe 2006). El consumo de alimento acumulado que tuvieron los pollos es semejante al de las tablas de objetivo de desempeño de Cobb 500 (Cobb - Vantres 2018); pese a que los animales estuvieron bajo condiciones altas de temperatura debido al verano.

La conversión alimenticia hasta los 28 días, no mostró diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ). De forma semejante Osorio *et al.* (2010) no encontraron diferencias estadísticas para el índice de conversión alimenticia entre los tratamientos, quienes usaron un probiótico comercial (*Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus reuteri*). Asimismo, Goulart (2014), al adicionar un probiótico



(*Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*) en la dieta de los pollos, hasta los 21 días de edad, mencionó que no hubo diferencias entre los tratamientos sobre la conversión alimenticia.

En contraste, Acosta *et al.* (2007) y Gutiérrez *et al.* (2015) presentaron un menor valor ( $p < 0,05$ ) para el índice de conversión alimenticia en las aves tratadas con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*, respectivamente. Asimismo, Jouybari *et al.* (2009) reportaron una conversión alimenticia mejorada (menor valor) en pollos de carne que recibieron un probiótico que contenía *Pseudomonas putida* y *Pantoea agglomerans*. Además, Arteaga *et al.* (2020) reportó un menor índice de conversión alimenticia a los 28 días con la adición de un probiótico en comparación de un control. También, Talebi *et al.* (2008) indicaron que un probiótico de múltiples cepas resultó en una disminución del índice de conversión alimenticia en pollos de carne en comparación con el grupo de control.

El uso de probióticos a base de varias cepas tienen mejor eficiencia que los probióticos constituidos a base de una sola cepa, en el efecto antibacteriano directo, la competencia por los nutrientes entre microorganismos y los efectos bactericidas, la estimulación de la inmunidad y la competencia en el sitio de adherencia (Chapman *et al.* 2011) que conlleva a una mejor eficiencia productiva. Asimismo, las cepas probióticas pueden ayudar a mantener la salud intestinal al proporcionar un equilibrio microbiano beneficioso en el tracto gastrointestinal, y un intestino sano y que funcione bien con trastornos digestivos reducidos garantizaría una mejor utilización y conversión de los alimentos, lo que mejoraría el crecimiento y la vitalidad de los animales (Fuller 2001).

Sin embargo, en nuestra investigación el uso de probióticos a base de una mezcla de tres cepas pertenecientes al filo actinomicetos no mejoró la conversión alimenticia a los 28 días de edad de los pollos. La conversión alimenticia es una medida de la productividad en un animal y se define como la relación entre el alimento que consume con el peso que gana (Castro y Chirinos 2008). Cobb Vantress (2012) define como la cantidad de alimento requerido para producir un kilogramo de peso vivo de pollo que se calcula semanalmente.

Estos resultados referentes al índice de conversión alimenticia en las aves suplementadas con probióticos muestran que, a pesar de no obtener resultados superiores a los otros tratamientos, su eficacia es similar a un antibiótico promotor de crecimiento; por lo que podría catalogarse como una buena alternativa de acuerdo con las exigencias actuales.

La mortalidad, hasta los 28 días de edad, no manifestó ninguna diferencia estadística entre los tratamientos. Sin embargo, no hubo ninguna mortalidad en el grupo T5 (dieta con Fórmula Probiótica II) y la suma total de muertos fue de seis pollitos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos reportados previamente por Gunal *et al.* (2006), Wondmeneh *et al.* (2011) y, Stęczny y Kokoszyński (2020) quienes administrando diferentes cepas bacterianas como probióticos no encontraron diferencias estadísticas para el porcentaje de mortalidad frente a los grupos controles.

En contraste a estos autores, varios estudios han encontrado una influencia positiva en el control y reducción de la mortalidad por uso de probióticos en diferentes condiciones (Pelicia *et al.* 2004, Timmerman *et al.* 2006, Aguavil 2012, Ortiz 2013, Gamboa 2014, González 2016, Huang *et al.* 2018, Menconi *et al.* 2020). También Cortés *et al.* (2000) evaluaron el efecto del *Bacillus toyoi* adicionado a la dieta de pollos de carne, demostrando que tenían efecto promotor de crecimiento y disminución de la mortalidad por Salmonella. Esto coincide con Pascual *et al.* (1999), quienes indican que los probióticos se han utilizado ampliamente para controlar la salmonela patógena en pollos para reducir la mortalidad; la salmonela es una de las enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos más importantes del mundo.

Los efectos de los probióticos consideran la mejora en el equilibrio microbiano intestinal al administrarse en concentraciones adecuadas y proporcionan protección contra los patógenos intestinales; siendo capaces de reducir la mortalidad y aumentar satisfactoriamente la conversión alimentaria, lo que mejora la capacidad digestiva, induciendo a un mejor crecimiento de microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal. La adición de los probióticos es más eficiente durante las primeras semanas de vida en los animales de granja, ya que mejoran la salud intestinal (Freitas *et al.* 2003). Asimismo, Salim *et al.* (2013) indica que la ingesta de probióticos tiene efectos positivos sobre el estímulo de la respuesta inmune y reduce la mortalidad y enfermedades. Además, Karimi *et al.* (2010) demostraron que la administración de probióticos en el alimento beneficia el rendimiento de pollos de carne mejorando algunos valores bioquímicos sanguíneos y la modulación inmune.

Por otro lado, Blajman *et al.* (2015) indican que una mayor cantidad de cepas bacterianas que se utilizan como probióticos pueden llegar a ser más costosos que las pérdidas asociadas a la mortalidad de los pollos de los grupos no tratados. En ese sentido, cabe señalar que sería viable las fórmulas probióticas propuestas a base de actinomicetos, grupos T4 y T5, ya que

utilizan solo tres cepas cada una; sin embargo, no demostraron diferencias significativas favorables, pero tampoco difieren del antibiótico promotor de crecimiento por lo que puede ser utilizado como alternativa de este.

Además, cabe señalar que la causa de mortalidad de los pollos del grupo T4 (dieta con Fórmula Probiótica I), aparentemente, no tiene nada que ver con la adición sino con problemas provenientes de la incubación; al realizar la necropsia de los pollos se diagnosticó onfalitis.

El índice de eficiencia productivo hasta los 28 días no mostró diferencia estadística, pero sí numérica entre los tratamientos, favoreciendo al T5 (dieta con Fórmula Probiótica II) seguido del T4 (dieta con Fórmula Probiótica I) con 421.18 y 418.64, respectivamente; esto se manifestó desde los 21 días de edad. Del mismo modo, Fernandes *et al.* (2014) usando un probiótico comercial que contenía *Lactobacillus sp* y *Enterococcus sp.* tampoco encontró diferencias estadísticas respecto de un grupo control.

Por otro lado, Chávez *et al.* (2016) utilizando *Enterococcus faecium* como probiótico concluyeron que puede ser considerada como un promotor de crecimiento durante todo el ciclo de producción del ave, debido a que obtuvo efectos positivos sobre el índice de eficiencia productivo europea y también en otros parámetros productivos; asimismo, Zaghari *et al.* (2020) hallaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) favorables para las aves que recibieron *Bacillus sp.* como probiótico (418.95) en comparación de un grupo control (374.49). Hallazgos similares a estos resultados son mencionados por otros autores, quienes reportan una mejora significativa con la adición de probióticos sobre el índice de eficiencia productivo europea (Ortiz 2013, González 2016).

El índice de eficiencia europea tiene como objetivo valorar los resultados zootécnicos del lote para determinar la rentabilidad económica. El número mínimo esperado para definir si un lote tiene buen comportamiento es de 200, por lo que cualquier resultado por debajo se estima que no fue un buen lote en cuanto a rendimiento (Anwar *et al.* 2012). Otros autores indican, si el resultado es mayor a 300 el lote es óptimo y si fuese un valor menor su rentabilidad también disminuye, en términos económicos (Tellez 2011, Aguavil 2012).

Respecto a las diferencias, con la mejora genética de las casas comerciales de pollos de carne, el índice de eficiencia europea ha incrementado su valor gradualmente. Por tanto, según los resultados desde la tercera semana todas las unidades experimentales sin distinción se encuentran por encima del valor mencionado indicando una alta rentabilidad con todos los tratamientos.

Ante las inconsistencias encontradas, Timmerman *et al.* (2006) resaltaron la importancia de la forma y el momento de la administración como factores principales que afectan la eficacia de las preparaciones probióticas. La administración a través del alimento, en comparación con la administración en el agua de bebida, resultó en un mayor aumento de la ganancia diaria promedio; además, la suplementación de probióticos durante la vida temprana es de gran importancia para el huésped porque las bacterias pueden modular la expresión de genes en las células epiteliales intestinales, creando así un hábitat favorable para ellas mismas (Gaggía *et al.* 2010).

En la presente investigación el uso de actinomicetos como probiótico generó un efecto positivo sobre el peso vivo y ganancia de peso al finalizar la crianza. Siendo el grupo T4 (dieta con Fórmula Probiótica I) quien obtuvo el mejor valor. Los demás indicadores productivos no mejoraron con su adición, pero tampoco tuvo efectos negativos; por tanto, podría permitirse su uso como alternativa de los antibióticos promotores de crecimiento.

#### 4.1.2. Peso relativo de órganos

Los promedios para el peso relativo de órganos digestivos a los 21 y 28 días de edad en los pollos de carne se resumen en el Cuadro 10. El peso relativo de los órganos digestivos (páncreas, hígado e intestino) a los 21 y 28 días de edad no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

**Cuadro 10: Peso relativo de órganos digestivos en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período / Órganos (%PV)	Tratamientos <sup>1</sup>					p-value
	T1	T2	T3	T4	T5	
<b>A los 21 días de edad</b>						
Páncreas	0.31 <sup>2</sup>	0.31	0.33	0.29	0.31	0.487
Hígado	2.51	2.63	2.71	2.37	2.42	0.0638
Peso de intestino	6.53	6.47	6.89	6.11	6.80	0.613
Longitud de intestino	16.43	16.66	16.34	15.71	16.17	0.788
<b>A los 28 días de edad</b>						
Páncreas	0.26	0.26	0.25	0.25	0.23	0.734
Hígado	2.32	2.22	2.00	2.24	2.09	0.328
Peso de intestino	6.03	5.76	5.95	5.80	5.76	0.982
Longitud de intestino	12.69	11.88	12.44	11.46	11.69	0.633

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I, T5: dieta con Fórmula Probiótica II.

<sup>2</sup>Valores son el promedio de ocho repeticiones (diez aves por repetición) por tratamiento

A los 21 y 28 días de edad, el peso relativo de los órganos que conforman el paquete visceral no mostraron diferencias estadísticas entre ninguno de los tratamientos. De forma semejante, García *et al.* (2007) usaron un probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en la alimentación de pollos de ceba Híbrido Comercial EB-34 por 42 días, sin encontrar diferencias estadísticas para el peso relativo del hígado. Asimismo, Shokryazdan *et al.* (2017) con el uso de *Lactobacillus salivarius* (CI1, CI2 and CI3) como probiótico no encontraron diferencias significativas favorables en los pesos relativos del hígado y páncreas a los 21 y 42 días de edad. Además, Martínez (2019) no mostró diferencias estadísticas respecto al peso relativo del hígado e intestino habiendo sido alimentadas las aves de la raza Leghorn con *Streptomyces sp.* RL8 hasta los 21 días.

Resultados similares son determinados por Kalavathy *et al.* (2003), Willis y Reid (2008) y Jwher *et al.* (2013) quienes evaluaron los efectos de probióticos a base de *Lactobacillus* sobre el peso relativo de hígado y páncreas sin encontrar diferencias significativas al ser comparados con el grupo control a los 21, 28, 35 y 42 días de edad de las aves. A estos autores se suman Brozca *et al.* (2000) y Zaghari *et al.* (2020) quienes tampoco reportan diferencias estadísticas al emplear probióticos en la dieta de pollos.

Sin embargo, Pedroso *et al.* (2003) agregando *Lactobacillus reuteri* y *L. johnsonii* en el agua de bebida reportaron un aumento significativo en el peso intestinal de pollos a los 21 días de edad. Asimismo, Chávez *et al.* (2016) mostraron diferencias estadísticas que favorecían el peso relativo de órganos (páncreas, hígado e intestino) en las aves que recibieron un probiótico (*Enterococcus faecium*) en agua durante 42 días. Además, Gorozabel *et al.* (2020) presentaron un mayor valor en el peso relativo de hígado en aves que bebieron el probiótico (*Lactobacillus spp.*) que fue añadido al agua de bebida en comparación de las aves control, así también obtuvieron mejores pesos promedios, índice de conversión alimenticia e índice de eficiencia productivo europea en comparación con el grupo control al finalizar el estudio. Respecto al hígado, García *et al.* (2007) mencionan que en ese órgano ocurre muchos procesos de síntesis y degradación que pueden enmascarar la acción directa que se ejerce sobre él cuando se emplean probióticos en la dieta

El incremento de peso de los órganos permitiría constatar que el uso de probióticos, retiene nutrientes suministrados en la dieta y por ende incrementaría la ganancia de peso y el desarrollo de órganos del animal (Alkhalif *et al.* 2010, Franz *et al.* 2011). Según Svihus (2011), al añadir a la dieta componentes que mejoran la disponibilidad de nutrientes, como sería el caso de los probióticos estimularía el crecimiento y desarrollo de órganos como la molleja y el proventrículo; éstos órganos no fueron evaluados en nuestra investigación. En contraste, Olnood *et al.* (2015) mencionan que aún se desconoce el mecanismo por el cual los probióticos tienen efecto sobre el peso de los órganos en animales. Por otro lado, Martínez (2019) menciona que no todos los probióticos ejercen influencia sobre todos los órganos.

Por tanto, la fuente probiótica empleada pudiera ser un factor determinante en las modificaciones de este indicador, índice morfométrico. Entonces podríamos indicar que los actinomicetos utilizados en los grupos T4 y T5 no afectan el índice morfométrico del hígado, páncreas e intestino. Aunque se requiere de más investigaciones para su afirmación.

### 4.1.3. Inmunocompetencia

Los promedios para los indicadores de la inmunocompetencia (índice morfométrico de órganos linfoides, diámetro de bursa y, relación bursa y bazo a los 21 y 28 días de edad en los pollos de carne se resumen en el Cuadro 11. Ninguno de los indicadores de la inmunocompetencia mostró diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos evaluados.

**Cuadro 11: Índice morfométrico de órganos linfoides y relación de bursa/bazo en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período/Medición	Tratamientos <sup>1</sup>					<i>p-value</i>
	T1	T2	T3	T4	T5	
<b>A los 21 días de edad</b>						
Bursa(%)	1.88	2.25	2.13	1.95	2.01	0.654
Bazo(%)	0.88	0.97	0.95	1.06	1.10	0.112
Timo(%)	5.56	5.40	5.04	4.87	5.28	0.799
Bursa/Bazo	2.28	2.31	2.29	1.92	1.83	0.414
Ø Bursa(cm)	5.38	5.50	5.63	5.63	5.63	0.829
<b>A los 28 días de edad</b>						
Bursa(%)	2.07	1.68	2.01	1.84	2.25	0.389
Bazo(%)	1.05	1.25	1.15	1.00	0.96	0.0506
Timo(%)	5.19	5.06	5.13	4.94	4.34	0.799
Bursa/Bazo	2.04	1.36	1.80	1.96	2.33	0.0644
Ø Bursa(cm)	6.13	6.13	6.25	6.25	6.50	0.813

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I, T5: dieta con Fórmula Probiótica II.

El índice morfométrico de la bursa con el peso corporal puede ser correlacionada con la inmunosupresión. Las aves con 3 a 6 semanas de edad tienen normalmente un índice morfométrico de 2 a 4; mientras, índices menores o igual a uno nos indica inmunosupresión (Giambrone 1996). Considerando los datos, las aves en el experimento se encontraron dentro del rango normal.

Según, Pulido *et al.* (2001) indican que la relación entre la bursa y el bazo con valores superior a 2 pueden ser considerados como propios de una inmunocompetencia adecuada. Considerando la valoración, fueron superiores en los grupos T2, T3 y T1 a los 21 días y, en T1 y T5 a los 28 días; pero, debido a la inexistente diferencia estadística asumimos que las

aves no fueron afectadas altamente por factores de estrés (infecciosos y no infecciosos) que pudieran alterar el normal desarrollo del sistema inmune en las aves de la presente investigación.

En nuestra investigación, los grupos suplementados con probióticos a base de *actinomicetos* no afectaron los pesos relativos de ninguno de los órganos linfoides tanto a los 21 y 28 días de edad. Esto indica que las fórmulas probióticas propuestas a base de actinomicetos no tienen efectos adversos sobre los órganos linfoides.

Hallazgos similares son reportados por otros autores como Awad *et al.* (2009), quienes al evaluar el efecto de un probiótico a base de *Lactobacillus* sobre la morfometría de órganos linfoides, no encontró diferencias significativas para timo, bursa y bazo respecto a un grupo control. Así mismo, Shokryazdan *et al.* (2017) con el uso de una mezcla de cepas de *Lactobacillus salivarius* como probiótico, no encontraron diferencias significativas favorables en los pesos relativos del bazo y bursa a los 21 días de edad frente al grupo control. Además, Martínez *et al.* (2019) no reportan diferencias estadísticas para el peso relativo de bazo entre aves que recibieron *Streptomyces sp.* RL8 y las que no recibieron ningún aditivo (grupo control) a los 21 días de edad de los pollos.

Por otro lado, Karimi *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la administración de probióticos en agua y alimento sobre la respuesta inmunitaria, incrementando significativamente el peso relativo de bazo y bursa por la administración de probióticos en comparación del grupo control. También Park y Kim (2014) suplementando con *Bacillus subtilis* B2A como probiótico, incrementó el peso de la bursa.

El timo, el bazo y la bolsa de Fabricio constituyen el principal órgano inmune de las aves, responsables de la inmunidad humoral y celular (Sakhare *et al.* 2007, Verduzco *et al.* 2010, Senthilkumar *et al.* 2018). Los órganos linfoides (timo, bazo y bolsa de Fabricio) se correlacionan con el intestino delgado; porque una mayor actividad y salud intestinal asegura una mayor producción de linfocitos T y B, aumentando el peso relativo de estos órganos hematopoyéticos en el ave joven (Huang *et al.* 2004, Rohollahzadeh *et al.* 2018). En ese sentido, considerando la relación, ninguno de los grupos en estudio se diferenció en el peso relativo del intestino.



Según Gore y Qureshi (1997) y Senthilkumar *et al.* (2018), el aumento del peso relativo de los órganos linfoides es un indicador asociado a una mejor respuesta inmune y resistencia a las enfermedades. Por otro lado, Martínez *et al.* (2013) no encontraron una relación entre un mayor peso relativo de los órganos linfoides y el peso, lo que podría estar relacionado con un aumento del gasto energético para la producción de células inmunitarias, lo que reduce el peso corporal en las pollitas.

En base a los resultados, el uso de cepas de actinomicetos como probióticos no afectan la inmunocompetencia (índice morfométrico de órganos linfoides, diámetro de bursa y relación entre bursa y bazo).

#### **4.1.4. Integridad intestinal**

##### **4.1.4.1. Evaluación macroscópica**

Los promedios para los indicadores en la evaluación macroscópica (pasaje de alimento, descamación celular, exceso de moco, exceso de efluído, hiperemia y gases) de la integridad intestinal a los 21 y 28 días se resumen en el Cuadro 12. De todos los criterios evaluados, solo la hiperemia a los 21 días muestra diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

A los 21 días, la hiperemia mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos; siendo el grupo T1 el más desfavorable con un mayor valor. Por tanto, se manifestó más la hiperemia cuando los pollos fueron alimentados sin ningún aditivo promotor de crecimiento. Asimismo, los grupos T4 y T5 no muestran diferencias estadísticas entre sí, ubicándose en posición intermedia respecto a los otros grupos. Mientras, a los 28 días, la hiperemia ya no muestra diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Considerando la puntuación máxima de disbacteriosis con estos 6 indicadores (medición de la integridad intestinal), todos los tratamientos mostraron encontrarse con un desequilibrio en la microbiota tanto a los 21 y 28 días. Según Bailey (2019) la población bacteriana del intestino delgado evoluciona a medida que el ave crece, pero, de manera general, se estabiliza a las dos semanas de edad si los pollitos gozan de condiciones de crianza óptimas, alimento y agua de buena calidad. Sin embargo, la microbiota puede demorar entre 3 y 4 semanas para alcanzar el nivel adulto; durante este período se observa estabilidad en el tracto digestivo.

Considerando los resultados, todos los grupos de aves padecieron de desequilibrio bacteriano, pero solo el grupo T4 obtuvo un mejor peso corporal tanto a los 21 y 28 días. Por tanto, el uso de actinomicetos como probióticos podría contrarrestar las perturbaciones digestivas (estrés ambiental, bacterias patógenas, coccidias) que se presentan en las aves.

**Cuadro 12: Indicadores para la evaluación macroscópica de la integridad intestinal en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período / Mediciones	Tratamientos <sup>1</sup> (n=8)				
	T1	T2	T3	T4	T5
<b>A los 21 días de edad</b>					
Pasaje de alimento	0.63 (5/8)	0.63 (5/8)	0.50 (4/8)	0.50 (4/8)	0.75 (6/8)
Descamación celular	1 (8/8)	0.88 (7/8)	0.88 (7/8)	0.75 (6/8)	0.88 (7/8)
Exceso de moco	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)
Exceso de fluido	0.25 (2/8)	0.88 (7/8)	0.63 (5/8)	0.63 (5/8)	0.38 (3/8)
Hiperemia	1 <sup>b</sup> (8/8)	0.38 <sup>a</sup> (3/8)	0.38 <sup>a</sup> (3/8)	0.63 <sup>ab</sup> (5/8)	0.88 <sup>ab</sup> (7/8)
Gases	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)
<b>A los 28 días de edad</b>					
Pasaje de alimento	0.13 (1/8)	0 (0/8)	0.13 (1/8)	0.13 (1/8)	0.25 (2/8)
Descamación celular	0.88 (7/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	0.88 (7/8)	0.88 (7/8)
Exceso de moco	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)
Exceso de fluido	0.38 (3/8)	0.50 (4/8)	0.38 (3/8)	0.50 (4/8)	0.50 (4/8)
Hiperemia	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)
Gases	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I, T5: dieta con Fórmula Probiótica II.

<sup>a, b, c</sup> Valores dentro de una fila con superíndice no común difieren significativamente (p<0.05).

En el Cuadro 13 se presenta el promedio de los niveles de lesión intestinal causada por especies de *Eimeria* y *Clostridium perfringens* tanto a los 21 y 28 días de edad; donde se muestra que no existe diferencias estadísticas entre ninguno de los tratamientos ( $p>0.05$ ). En ambas fechas, se registraron lesiones a nivel del yeyuno y sacos ciegos compatibles con *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, respectivamente; mientras, no se observaron lesiones compatibles con *Eimeria acervulina* y *Clostridium perfringens* en ninguno de los tratamientos.

Considerando la puntuación máxima de coccidiosis, todos los tratamientos se encontraron por debajo del valor permitido tanto a los 21 y 28 días. El grupo T2, pudo controlar las coccidias hasta los 21 días ya que contenía coccidiostatos; sin embargo, pese a que los demás no contenían el producto no se diferenciaron de éste. Por otro lado, cabe señalar que el grupo T2 fue quien obtuvo un bajo valor en el peso corporal y el grupo T4 mejor valor significativo en el peso corporal a los 28 días de edad.

Por tanto, la adición de actinomicetos como probióticos puede ser una alternativa favorable a los antibióticos promotores de crecimiento; pese a que no hay un decremento en la presentación de la coccidiosis, no existe diferencias estadísticas con la adición. Asimismo, su asociación con los parámetros productivos en especial el peso corporal.

**Cuadro 13: Lesiones por parásitos intestinales en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación de probióticos**

Período / Medidas	Tratamientos					<i>p-value</i>
	T1 <sup>1</sup>	T2	T3	T4	T5	
<b>A los 21 días de edad</b>						
Lesiones por <i>Eimeria acervulina</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	sd
Lesiones por <i>Eimeria maxima</i>	0.63	0.00	0.38	0.25	0.25	0.1888
Lesiones por <i>Eimeria tenella</i>	0.13	0.00	0.13	0.00	0.13	0.7159
Lesiones por <i>Clostridium perfringens</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	sd
<b>A los 28 días de edad</b>						
Lesiones por <i>Eimeria acervulina</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	sd
Lesiones por <i>Eimeria maxima</i>	0.75	0.75	0.88	0.63	1	0.8387
Lesiones por <i>Eimeria tenella</i>	0.13	0.00	0.00	0.13	0.00	0.5447
Lesiones por <i>Clostridium perfringens</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	sd

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I, T5: dieta con Fórmula Probiótica II.

#### 4.1.4.2. Evaluación microscópica: Histomorfometría intestinal

Los promedios para los indicadores en la evaluación microscópica (altura y ancho de vellosidad, profundidad de cripta e índice intestinal) de la integridad intestinal a los 21 y 28 días se resumen en el Cuadro 14. A los 21 días, no muestra diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos para la altura y ancho de vellosidad; mientras, para la profundidad de cripta e índice intestinal, sí se mostró diferencia estadística ( $p<0.05$ ). A los 28 días, el ancho de vellosidad tanto en duodeno como en yeyuno, no muestran diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos; mientras, la altura de la vellosidad (solo en yeyuno), la profundidad de cripta (yeyuno y duodeno) e índice intestinal (duodeno) sí mostraron diferencia estadística ( $p<0.05$ ).

El crecimiento de los pollos está directamente ligado a la digestión y absorción de nutrientes, lo cual es resultado del desarrollo morfológico y funcional del intestino delgado. La altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas e índice intestinal, la proliferación de las criptas, la tasa de migración de los enterocitos, la actividad de las enzimas mucosas y el desarrollo de las células caliciformes son buenos indicadores de la capacidad funcional del intestino (Al-Sultan *et al.* 2016, Santos *et al.* 2016, Jong *et al.* 2017).

A los 21 días de edad, el valor promedio de la profundidad de cripta tanto para duodeno como para yeyuno muestran diferencias estadísticas entre los tratamientos; una menor profundidad de cripta se observa en las aves alimentados con el probiótico comercial (T3) a nivel de duodeno y todos los tratamientos, excepto el grupo T1, a nivel del yeyuno.

Respecto al índice intestinal (relación de altura de vellosidad y profundidad de la cripta) tanto para duodeno y yeyuno muestran diferencias estadísticas entre los tratamientos; un mayor índice intestinal se observa en las aves del grupo T2 y T3 en duodeno y en todos los tratamientos, excepto el grupo T1, en yeyuno. A pesar, que todos los grupos de aves obtuvieron un mejor índice intestinal a nivel de yeyuno, solo los grupos que utilizaron el probiótico a base de actinomicetos obtuvieron mejores valores significativos ( $p<0.05$ ) en peso corporal a los 21 días de edad. Esto podría indicar que en otras porciones del intestino se dio una mayor absorción de nutrientes que dieron lugar al incremento de peso.

Otras investigaciones reportadas previamente como Goulart (2014), quien al adicionar probióticos (*Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*) en la dieta de pollos, mencionó que no hubo ningún efecto del tratamiento sobre la altura de las vellosidades

intestinales y profundidad de las criptas en los pollos evaluados, frente al testigo a los 21 días de edad; Calik *et al.* (2019) observaron un incremento en la profundidad de cripta en yeyuno a los 21 días de edad en aves alimentadas con un probiótico a base de *Bacillus amyloliquefaciens* en comparación a los grupos control (dieta basal sin desafío y otro con dieta basal desafiado con coccidias).

A los 28 días de edad, el valor promedio de la altura de vellosidad de la porción yeyuno muestran diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos; siendo las dietas sin APC (T1), dieta con Fórmula Probiótica I (T4) y dieta con Fórmula Probiótica II (T5) los de mayor valor respecto a los otros grupos. De forma semejante Fallah *et al.* (2013), quienes agregaron un probiótico comercial en la alimentación de pollos de carne, obtuvieron a nivel de duodeno y yeyuno, vellosidades más altas. Asimismo, Chávez *et al.* (2016) reportaron una mayor altura de vellosidad a nivel de duodeno y yeyuno, suministrando probióticos a base de solo una cepa en agua, obteniendo mejor resultado cuando el probiótico era a base de *Enterococcus faecium*. Diversos estudios respaldan el efecto positivo en la adición de probióticos sobre el incremento del largo de la vellosidad intestinal en las aves (Kazemi *et al.* 2019, Medina 2019, Calik *et al.* 2019, Gorozabel *et al.* 2020).

Las vellosidades de mayor tamaño significan un incremento en la función digestiva y una mayor absorción de nutrientes en el intestino debido al aumento de la superficie de absorción, como consecuencia, tiene un efecto beneficioso sobre el crecimiento y desarrollo del animal (Jeurissen *et al.* 2002, Jamroz *et al.* 2005). Esto coincide con el grupo T4 que recibió la Fórmula Probiótica I, el mejor peso corporal obtenido puede asociarse al aumento en la altura de vellosidades que obtuvo a los 28 días de edad.

Respecto a la profundidad de cripta a nivel del duodeno y yeyuno, mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos; una menor profundidad de cripta se observa en el grupo T3 y T4, y solo el grupo T3 en duodeno y yeyuno, respectivamente. Por otro lado, el grupo T1, aves que no recibieron ningún aditivo, tuvo la mayor profundidad de cripta en ambas porciones.

Las criptas son responsables de la producción de los enterocitos (mecanismo de la renovación de las vellosidades), estos se multiplican y migran a la base de la vellosidad empujando a las demás células a una posición más externa, estos van ascendiendo por la vellosidad pasando de ser células relativamente indiferenciadas (en las criptas) a células

especializadas (en la vellosidad), estas se van perdiendo en la luz intestinal al alcanzar los extremos de las vellosidades debido a la edad y exposición al contenido intestinal (Cunningham 2005).

Una profundidad de cripta mayor es indicativa de un recambio tisular más rápido y, quizás, una mayor demanda de nuevos tejidos (Jeurissen *et al.* 2002, Utiyama 2004, Tiwari *et al.* 2018). Criptas más profundas pueden provocar una mala absorción de nutrientes, un aumento de la secreción en el tracto gastrointestinal y por ende un menor rendimiento productivo (Xu *et al.* 2003). En ese sentido, quienes necesitaron de un recambio tisular para recuperar la pérdida epitelial por daño fueron los grupos T1, T2 y T5; mientras, los grupos T3 y T4 obtuvieron una menor profundidad indicando que no había necesidad de compensar tejido epitelial.

Mientras, el índice intestinal a nivel de duodeno mostró diferencias significativas entre los tratamientos; un mayor índice intestinal se observa en las aves del grupo T3, seguido de los grupos alimentados con las fórmulas probióticas a base de actinomicetos (T4 y T5). Resultados similares se observan en la investigación de Chávez *et al.* (2016), quienes mostraron mayor índice intestinal tanto para duodeno y yeyuno, suministrando probióticos a base de solo una cepa (*Enterococcus faecium*). Asimismo, Cao *et al.* (2013) incluyeron en la alimentación de pollos de carne *Enterococcus faecium*, resultando un mayor índice intestinal en comparación con el grupo control.

El índice intestinal está asociado a la eficiencia de crecimiento y la superficie de absorción de nutrientes; por tanto, un bajo índice intestinal indicaría una mayor tasa de renovación celular pero insuficiente para incrementar el tamaño de las vellosidades (Awad *et al.* 2009, Clevers 2013). Un bajo índice intestinal es asociado con presencia de toxinas (Medina *et al.* 2015); mientras un alto índice intestinal representa un intestino delgado con mayor capacidad de digestión y absorción (Vallejos *et al.* 2015). En ese sentido, los grupos T3 seguido del T4 y T5 obtuvieron un mayor índice intestinal asegurando la digestión y absorción de forma óptima; sin embargo, solo el grupo T4 (dieta con Fórmula Probiótica I) incrementó significativamente el peso corporal a los 28 días. Esto podría indicar que la dieta con el probiótico I tiene efectos sobre otras porciones del intestino que permitan maximizar la absorción de nutrientes.

**Cuadro 14: Histomorfometría intestinal en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 28 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período/Medidas	Segmento del intestino	Tratamiento <sup>1</sup>				
		T1	T2	T3	T4	T5
<b>A los 21 días</b>						
Altura de vellosidad (um)	Duodeno	1716.05	1775.26	1685.51	1698.94	1737.22
	Yeyuno	1147.20	1192.95	1147.31	1176.17	1177.56
Profundidad de cripta (um)	Duodeno	289.42 <sup>a</sup>	252.25 <sup>bc</sup>	231.74 <sup>c</sup>	271.61 <sup>ab</sup>	251.28 <sup>bc</sup>
	Yeyuno	271.45 <sup>a</sup>	221.93 <sup>b</sup>	212.99 <sup>b</sup>	239.86 <sup>b</sup>	229.24 <sup>b</sup>
Ancho de vellosidad (um)	Duodeno	154.98	154.40	157.40	155.53	143.17
	Yeyuno	145.67	146.39	152.01	141.33	138.30
Índice intestinal (um/ um)	Duodeno	5.94 <sup>c</sup>	7.04 <sup>a</sup>	7.28 <sup>a</sup>	6.27 <sup>bc</sup>	6.92 <sup>ab</sup>
	Yeyuno	4.27 <sup>b</sup>	5.36 <sup>a</sup>	5.36 <sup>a</sup>	4.93 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>
<b>A los 28 días</b>						
Altura de vellosidad (um)	Duodeno	1935.52	1951.09	1961.08	1890.18	1983
	Yeyuno	1293.40 <sup>a</sup>	1263.06 <sup>ab</sup>	1134.01 <sup>b</sup>	1287.15 <sup>a</sup>	1354.38 <sup>a</sup>
Profundidad de cripta (um)	Duodeno	320.57 <sup>a</sup>	309.36 <sup>ab</sup>	281.37 <sup>b</sup>	287.87 <sup>b</sup>	307.71 <sup>ab</sup>
	Yeyuno	267.60 <sup>a</sup>	273.10 <sup>a</sup>	231.26 <sup>b</sup>	264.61 <sup>a</sup>	288.43 <sup>a</sup>
Ancho de vellosidad (um)	Duodeno	174.33	177.82	163.74	181.50	168.63
	Yeyuno	163.84	155.98	160.98	165.39	159.68
Índice intestinal (um/ um)	Duodeno	6.09 <sup>b</sup>	6.42 <sup>b</sup>	7.04 <sup>a</sup>	6.65 <sup>ab</sup>	6.50 <sup>ab</sup>
	Yeyuno	4.87	4.65	4.92	4.89	4.70

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I, T5: dieta con Fórmula Probiótica II.  
<sup>a, b, c</sup> Valores dentro de una fila con superíndice no común difieren significativamente (p<0.05).

## 4.2. ESTUDIO II - DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA PARA LA INCLUSIÓN DEL PROBIÓTICO A BASE DE ACTINOMICETOS

### 4.2.1. Parámetros productivos

El promedio para el peso vivo inicial, peso vivo final, ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad y eficiencia productiva europea de los pollos por efecto de la suplementación de probióticos hasta los 42 días de edad se resumen en el Cuadro 15. El índice de eficiencia productivo europea fue afectado significativamente ( $p < 0.05$ ) por la adición de la Fórmula Probiótica I de concentración  $10^4 \times 10^5$  UFC/g (T4), siendo diferente y mayor respecto a los grupos T1(control) y T2 (dieta con APC).

El peso vivo final hasta los 42 días de edad no mostró diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos. Sin embargo, existe una diferencia numérica a favor de los pollos que contenían probióticos en su dieta (T3, T4, T5 y T6). Hallazgos similares han sido reportados previamente por Murry *et al.* (2006), Osorio *et al.* (2010), Olnood *et al.* (2015) y Abudabos *et al.* (2017) quienes administrando diferentes cepas y consorcios bacterianos no encontraron diferencias estadísticas para el peso del ave frente a los grupos control.

Por otro lado, hay estudios que muestran efectos positivos de distintos probióticos sobre el peso vivo como Chávez *et al.* (2016), quienes reportaron mejores valores ( $p < 0.05$ ) en aves suplementadas con *Lactobacillus sp.* ( $10^8$  UFC/ml) en el agua de bebida frente a los grupos control hasta los 42 días. Asimismo, Lin *et al.* (2019) reportan diferencias estadísticas favorables con el uso de *Bacillus coagulans* TBI-C169 ( $1 \times 10^6$  UFC/g) como probiótico (2849.49 g) entre el control (2715.49 g) a los 42 días. También Shokryazdan *et al.* (2017) usando como probiótico una mezcla de cepas *L. salivarius* (CI1, CI2 and CI3) con concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/g a dosis de 500 y 1000 g/TM de la dieta a los pollos de carne durante 42 días mejoró el peso corporal respecto del grupo control. Nótese en este último experimento, la dosis fue superior a las propuestas en nuestra investigación.



**Cuadro 15: Comportamiento productivo en pollos de carne de la línea Cobb500 suplementados con distintas concentraciones de probióticos (Período de 1 a 42 días de edad)**

Mediciones	Tratamiento <sup>1</sup>					
	T1 <sup>1</sup>	T2	T3	T4	T5	T6
Peso vivo inicial, g/ave	44.99 <sup>2</sup>	44.85	44.87	44.76	45	44.83
Peso vivo final, g/ave	3392.66	3395.14	3445.06	3452.82	3435.14	3435.49
Ganancia de peso, g/ave	3347.66	3350.29	3400.2	3408.07	3390.19	3390.66
Consumo de alimento, g/ave	5749.12	5748.05	5663.01	5687.65	5648.94	5640.65
Conversion alimenticia, g/g	1.72 <sup>b</sup>	1.71 <sup>b</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>
Mortalidad, %	3.13	1.56	4.69	0.78	1.56	1.56
Eficiencia productiva europea	455.43 <sup>c</sup>	463.86 <sup>bc</sup>	469.47 <sup>abc</sup>	489.18 <sup>a</sup>	483.31 <sup>ab</sup>	484.38 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I-C1(10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> UFC/g), T5: dieta con Fórmula Probiótica I-C2 (10<sup>8</sup> - 10<sup>10</sup> UFC/g), T6: dieta con Fórmula Probiótica I-C3 (10<sup>16</sup> - 10<sup>20</sup> UFC/g).

<sup>2</sup> Valores son el promedio de ocho repeticiones (16 aves por repetición) por tratamiento

<sup>a, b, c</sup> Valores dentro de una fila con superíndice no común difieren significativamente (p<0.05).

Los resultados variados por efecto de los probióticos sobre el rendimiento productivo de pollos de carne pueden atribuirse a las diferencias que existe entre cepas de bacterias utilizadas como suplementos. Asimismo, otra de las causas es la concentración de probióticos en la dieta; generalmente se recomienda como tasa de inclusión  $10^8$  UFC/g de aditivo probiótico comercial para alimentos (Chen *et al.* 2015).

A pesar de no mostrar diferencias significativas en el peso vivo final, podemos observar que el uso de la nueva formulación de probióticos a base de actinomicetos, sea cual fuere la concentración propuesta, puede ser un posible reemplazo de los antibióticos promotores de crecimiento.

Sin embargo, a los 35 días de edad, la inclusión de probióticos a base de actinomicetos en la dieta del T4 y T5 mostraron mejores valores significativos ( $p < 0.05$ ) para el peso vivo a comparación de los otros tratamientos. Núñez *et al.* (2017), utilizaron Enterogermina (esporas de *Bacillus clausii*) en diferentes dosis y concentraciones en el agua, concluyendo que dosis superiores a 0.50 ml/l con  $2 \times 10^{11}$  UFC/l del producto no consiguen mejorar los parámetros productivos. Demostrando la eficacia de los actinomicetos como probióticos y que a una concentración superior de microorganismos en la dieta no sería favorable, como lo es el grupo T6 (Fórmula Probiótica I-C3,  $10^{16}$  -  $10^{20}$  UFC/g).

La ganancia de peso hasta los 42 días de edad no mostró diferencias estadísticas entre los grupos. Por otro lado, existe diferencia numérica a favor de las aves que recibieron algún probiótico (T3, T4, T5 y T6); esta tendencia se observó también en el peso vivo. Hallazgos similares son reportados por Gunal *et al.* (2006), Murry *et al.* (2006), Li *et al.* (2008), Osorio *et al.* (2010) y Chen *et al.* (2015) quienes usaron diferentes cepas como probiótico en distintas concentraciones sin mostrar un efecto favorable frente a los controles.

En contraste a este resultado, Zaghari *et al.* (2020) reportaron diferencias estadísticas con un incremento en la ganancia de peso de las aves que consumieron *B. licheniformis* en comparación del control; pero los pesos reportados son inferiores a esta investigación. Asimismo, Shokryazdan *et al.* (2017) reportan diferencias estadísticas favorables en aves que recibieron un probiótico a base de cepas *Lactobacillus salivarius* (CI1, CI2 and CI3) a dosis de 500 y 1000 g/TM de alimento hasta los 42 días respecto al grupo control. Del mismo modo, Núñez *et al.* (2017) quienes administrando enterogermina (*Bacillus clausii* spores) a una concentración de  $2 \times 10^{11}$  UFC/l y como dosis 0.50 ml/l en agua de bebida obtuvo un

resultado favorable estadísticamente respecto del grupo control, quien no recibió ningún aditivo. Resultados similares fueron reportados por Apata (2008) y Zhang y Kim (2014) quienes usando diferentes cepas como probiótico mostraron un efecto favorable frente a los controles.

La ganancia de peso está asociada con un incremento en la digestión y absorción de nutrientes de la dieta, asimismo, esta deriva del incremento de la actividad enzimática en el intestino por parte de los probióticos o al cambio inducido en la población microbiana y, por tanto, a la producción de enzima (FAO 2016). En el experimento realizado, existe diferencia numérica a favor de las aves de los grupos T3, T4, T5 y T6; siendo estos grupos de aves quienes recibieron probióticos en la dieta.

El consumo acumulado hasta los 42 días de edad no mostró diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos. Hallazgos similares son reportados por otros autores; suplementando con un probiótico a base de cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus* en dosis de 1 g/kg de alimento y a una concentración de  $2 \times 10^9$  UFC/g (Mountzouris *et al.* 2007), esporas de *Bacillus clausii* en agua de bebida en distintas concentraciones (Núñez *et al.* 2017), una mezcla de *Lactobacillus* CI1, CI2 y CI3 en dosis de 0.5 y 1 g/kg de alimento (Shokryazdan *et al.* 2017), una mezcla de *Bacillus subtilis* 20Bp y *Lactobacillus brevis* 40Lp en dosis de 1 ml/kg de alimento y a una concentración de  $10^9$  UFC/g (Arteaga *et al.* 2020), probióticos comerciales que contenían principalmente cepas de *Lactobacillus sp*, *Bacillus sp*, *Bifidobacterium sp* y *Streptococcus sp*. (Stęczny y Kokoszyński 2020) no reportaron diferencias significativas en comparación de un control hasta los 42 días de edad.

Por otro lado, Karimi *et al.* (2010) administraron un probiótico que contenía *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* y *Candida pintolopesii* en dosis de 0.5 g/l en agua de bebida y 1 g/kg de alimento, ambos grupos de aves incrementaron significativamente el consumo de alimento respecto del control hasta los 42 días. Tenemos también a Jurado *et al.* (2020), quienes suplementado con *Lactobacillus casei* microencapsulado observaron un incremento significativo en el consumo de alimento y por ende en ganancia de peso al ser comparado con el grupo control, probiótico comercial y *Lactobacillus casei* sin microencapsular en pollos Ross hasta los 42 días de edad. Otros autores también muestran un incremento significativo en el consumo de alimento al

adicionarle probióticos en su dieta (Rahman *et al.* 2009, Abdel y Abd 2011) y un bajo consumo de alimento significativo (Mokhtari *et al.* 2010, Amerah *et al.* 2013, Chen *et al.* 2015).

Existe variación en los resultados de las investigaciones usando probióticos en el consumo de alimento, el efecto es inconsistente; según Ferreira y Kussakawa (1999), la diferencia en los resultados podría estar relacionada con varios factores: aves, cepa probiótica, dosis y concentración. La adición de un probiótico en dosis de 0,1 a 2 g/kg del alimento con una concentración no menor de  $6 \times 10^7$  UFC/ g para pollos de carne mostró un impacto positivo en la tasa de crecimiento (Amerah *et al.* 2013). La dosis propuesta en la investigación para el probiótico fue de 0,1g/kg de alimento, lo cual sugería el probiótico comercial utilizado para el grupo T3, concordando con el autor anterior; mientras la concentración utilizada estuvo por debajo de lo señalado.

En la presente investigación, los valores encontrados para el consumo acumulado de alimento hasta los 42 días en todos los grupos experimentales supera el consumo estándar de 4999 g reportado por el manual de la Línea Cobb 500 (Cobb-Vantress 2018). Asimismo, se observa una ligera diferencia numérica a favor del T3 (dieta con *Bacillus subtilis*), T4 (concentración baja de la Fórmula Probiótica I), T5 (concentración media de la Fórmula Probiótica I) y T6 (concentración alta de la Fórmula Probiótica I) quienes tuvieron menores valores no significativos.

Los grupos mencionados muestran mejores valores no significativos para la ganancia de peso; esto se contrasta con Jones *et al.* (2018), quienes asumen que un mayor consumo de alimento trae consigo una mejor ganancia de peso y mejora la rentabilidad del sistema. Por otro lado, Amerah *et al.* (2013) indican que la suplementación con probióticos reducen la ingesta de alimento y mejora la conversión alimenticia, ejerciendo un efecto beneficioso en pollos de carne. Esto deriva de la integridad intestinal que conduce a una mejor digestión y absorción de nutrientes debido a una mayor disponibilidad de ellos (Bedford 2000).

El índice de conversión alimenticia a los 42 días de edad con la inclusión de aditivos probióticos (T3, T4, T5 y T6) en la dieta, sin importar la concentración, disminuyó su valor. De forma semejante existen otros autores; suplementando con 0.1% de una mezcla de 12 cepas de *Lactobacillus* (Kalavathy *et al.* 2003), suplementando con 0.1% de un probiótico que contenía de *Lactobacillus* (Murry *et al.* 2006), un probiótico a base de una mezcla de

cepas ( $2 \times 10^{12}$  UFC/kg de producto) administrado a 1g/kg de alimento (Mountzouris *et al.* 2007), adicionando cepas probióticas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* o *Enterococcus faecium*) a una dosis de 2.5g/50l de agua (Chávez *et al.* 2016), un probiótico que contenía una mezcla de *Bacillus subtilis* 20Bp y *Lactobacillus brevis* 40Lp en dosis de 1 ml/kg de alimento ( $10^9$  UFC/g) (Arteaga *et al.* 2020) muestran una disminución significativa en la conversión alimenticia en aves hasta los 42 días respecto a las aves del grupo control. Del mismo modo, algunos estudios reportaron que la suplementación con probióticos en la dieta puede mejorar la conversión alimenticia en pollos (Kabir *et al.* 2004, Acosta *et al.* 2007, Nayebpor *et al.* 2007, Apata 2008, Talebi *et al.* 2008, Ignatova *et al.* 2009; Sen *et al.* 2012, Gutiérrez *et al.* 2015).

Una mejor conversión alimenticia en aves suplementadas con probióticos puede asociarse con un aumento de la digestión y absorción de nutrientes (digestibilidad de los nutrientes), esto a su vez por el aumento de la actividad enzimática en el intestino debido a la presencia de cepas probióticas (FAO 2016). El aumento de la actividad enzimática en el tracto gastrointestinal de las aves que recibieron probióticos podría ser consecuencia de la producción de enzima por parte del probiótico en sí o al cambio inducido en la población microbiana y, por tanto, a la producción de enzima (Yeo y Kim 1997, FAO 2016).

En contraste a los resultados obtenidos, Chen *et al.* (2019) no reportó diferencia entre el consumo de probióticos a base de *Bacillus spp.* ( $1 \times 10^6$  cfu/g) y el control. De igual forma, otros autores no muestran diferencias significativas entre grupos de aves que recibieron probióticos con aves del grupo control (Osorio *et al.* 2010, Rahimi *et al.* 2011, Wolfenden *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2013, Kazemi *et al.* 2019).

Las diferencias que se pueden observar en los distintos estudios puede deberse a una variedad de factores que alteran la eficacia de un probiótico en pollos (Zaghari *et al.* 2020); tales como las cepas de bacterias utilizadas, composición y viabilidad de las bacterias, métodos de preparación, dosis del probiótico, metodología de aplicación, dieta, estado y edad de las aves, estrés ambiental (temperatura y la densidad de población) (Patterson y Burkholder 2003, Mountzouris *et al.* 2007, Molnár *et al.* 2011, Landy y Kavyani 2013, Lee *et al.* 2014). El uso de probióticos tiene efectos positivos sobre la ingesta de alimento y la conversión alimenticia; sin embargo, aún no ha sido consistente entre los estudios o con diferentes probióticos (FAO 2016).

En la presente investigación, los valores encontrados para la conversión alimenticia en todos los grupos experimentales supera el índice de conversión alimenticia acumulada estándar de 1.59 reportado por el manual de la Línea Cobb 500 (Cobb-Vantress 2018). Con los probióticos obtuvimos resultados inferiores respecto a los grupos de aves del tratamiento T1 (grupo control) y T2 (aves suplementadas con APC), quienes incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) el índice de conversión desde la semana 5. La conversión alimenticia es una medida de la productividad y se define como la relación entre el alimento que consume con el peso que gana; cuanto menor sea la conversión más eficiente será el animal (Rodríguez 2007).

La mortalidad hasta los 42 días de edad, expresada en porcentaje, no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). De forma semejante Gunal *et al.* (2006) no encontraron diferencias estadísticas entre el grupo control (6.25%) y probiótico (6.25%) a base de un consorcio de cepas de distintos géneros con un mínimo de  $6 \times 10^7$  UFC/g de producto hasta los 42 días. Asimismo, Murry *et al.* (2006) no encontró diferencias estadísticas entre los controles y el probiótico (4.76%) a base de *Lactobacillus* en dosis de 0.10 % en el alimento hasta los 42 días. Además, Osorio *et al.* (2010) empleando un consorcio de microorganismo a una dosis de 20g/500 ml de agua, el cual fue brindado solo por dos días después de cada cambio de alimento no mostró diferencias estadísticas en el porcentaje de mortalidad (7.2 %) con el grupo control (5.4 %) y el grupo que recibió un antibiótico promotor de crecimiento (5.4 %).

Ante estos resultados, Anderson *et al.* (1999) y Gunal *et al.* (2006) indican que la falta de efecto de un promotor de crecimiento puede estar asociado con las condiciones de ambiente; pollitos sanos y bien alimentados no responden positivamente a los promotores del crecimiento (probióticos, ácidos orgánicos o antibióticos) cuando se alojan en condiciones limpias y con una densidad de alimentación moderada.

Por otro lado, Arteaga *et al.* (2020) mostraron un menor porcentaje de mortalidad (3%) con el grupo que recibió una mezcla probiótica (*Bacillus subtilis* 20Bp y *Lactobacillus brevis* 40Lp) con una dosis de 1 ml/kg del biopreparado ( $10^9$  UFC/g) en comparación de un control hasta los 42 días. Asimismo, Timmerman *et al.* (2006) indican que pollos tratados con probióticos reducen ligera o marcadamente la mortalidad. Otros autores como Calle (2011), Aguavil (2012), Arévalo (2016), Medina (2019) y Hmani *et al.* (2017) concuerdan en que el uso de probióticos en pollos de carne permite la reducción de la mortalidad comparada al grupo control (aves que no reciben ningún aditivo) a los 42 días de edad.

Respecto a la adición de probiótico a base de actinomicetos, el grupo T4 (concentración menor de la Fórmula Probiótica) tuvo solo un deceso en la primera semana, el grupo T5 (concentración media de la Fórmula Probiótica) tuvo un deceso en la cuarta semana y otro en la sexta semana, y el grupo T6 (concentración alta de la Fórmula Probiótica) tuvo un deceso en la segunda y quinta semana; por tanto, la mortalidad que se presentó en el grupo T4 al finalizar la crianza mostró un valor numérico inferior al resto, cabe señalar que fue un descarte por enanismo. Estos grupos de aves y el grupo T3 (*Bacillus subtilis*) tuvo un mayor peso no significativo ( $p>0.05$ ) a los 42 días, pero este último grupo obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad no significativo ( $p>0.05$ ).

Ante esto, Huaringa (2019) menciona que existe una relación directa entre el peso del ave con los niveles de mortalidad, indicando que pollos con mayor peso son más sensibles a los cambios de temperatura y al estrés. Por lo observado en nuestra investigación, la suplementación con probióticos a base de actinomicetos puede ser una mejor opción para obtener un mayor peso y al control del estrés que pueden generar la mortalidad en aves.

Los probióticos tuvieron un impacto positivo en la eficiencia productiva europea desde la segunda semana, principalmente los probióticos a base de actinomicetos. A las seis semanas, 42 días de edad, el índice de eficiencia productiva fue superior ( $p<0.05$ ) para el T4 (concentración menor de la Fórmula Probiótica) con 489.18, seguido del T5 (concentración media de la Fórmula Probiótica) con 483.31 y T6 (concentración alta de la Fórmula Probiótica) con 484.38. Hallazgos similares son reportados por otros autores, utilizando *Lactobacillus* como probiótico en dosis de 1,5 ml/l en agua incrementaron el índice de eficiencia productiva europea (Gorozabel *et al.* 2020).

Por otro lado, Osorio *et al.* (2010) no reportaron un incremento en el índice de eficiencia productivo por efecto de la adición de un consorcio de bacterias probióticas comparada a los grupos control hasta los 42 días de edad. También, Fernandes *et al.* (2014) quienes utilizaron un consorcio de bacterias de concentración  $10^7$  UFC/g en dosis de 150 g/TM en el alimento de inicio y 100 g/TM en el alimento de crecimiento, no mostraron diferencias estadísticas favorables frente a los grupos controles (sin aditivos y con antibiótico promotor de crecimiento).

El índice de eficiencia productivo europea, es una de las medidas más importantes en la evaluación del desempeño del lote porque utiliza las medidas anteriores evaluadas (peso vivo, conversión alimenticia y viabilidad) y las resume en un solo índice que mide la eficiencia del lote (Molero *et al.* 2001, Rodríguez 2007). Mientras más alto sea su valor, mejor será el rendimiento económico; Ortiz (1997) y Awad *et al.* (2009) consideran aceptable un valor sobre 200 y Muñoz (2010) superior a 300.

En nuestra investigación, el índice de eficiencia productiva supera el valor de 400; además, realizando la comparación con los otros experimentos mencionados, la presente investigación es mayor. El grupo T4, quien recibió la mezcla de cepas de actinomicetos en dosis de 1 g/TM de alimento balanceado y cuya concentración fue menor incrementó significativamente el índice de eficiencia productivo europea, seguido de los grupos T5 y T6, ambos recibieron también la mezcla de cepas de actinomicetos en concentraciones media y alta.

Por tanto, finalizada la crianza, la inexistente diferencia estadística entre las aves que recibieron los probióticos a base de actinomicetos indistintamente su concentración con los grupos control en los otros indicadores productivos demuestra similitud con el antibiótico promotor de crecimiento, permitiendo su uso alternativo.

Sin embargo, a los 14 y 21 días de edad, las aves que recibieron el antibiótico promotor de crecimiento (T2) mostraron un menor valor significativo para el peso vivo, ganancia de peso, índice de conversión alimenticia y eficiencia productiva europea. El antibiótico promotor de crecimiento utilizado fue tilosina; la tilosina es activa contra bacterias Gram-positivas, también actúan sobre algunas Gram-negativas (Lewicki 2006). Además, se conoce que uno de los factores que afecta la microbiota intestinal de las aves son los antibióticos que perturban el equilibrio, estabilidad y reducen las bacterias pertenecientes a los *Lactobacillus* (Mancabelli *et al.* 2016). Algunas especies de *Lactobacillus*, en el ave, permiten el mantenimiento normal de la microbiota intestinal por exclusión competitiva y antagonismo, incrementando la actividad digestiva y reduciendo la actividad enzimática microbiana y productora de amonio (Kabir 2009). Por tanto, la presencia de antibióticos causa una inestabilidad en la microbiota intestinal; el establecimiento de la microbiota intestinal en pollos de carne dentro de crianzas comerciales se da aproximadamente a las tres semanas de vida (Johnson y Foster 2018).



Por otro lado, a los 21 días de edad, el grupo T3, T5 y T6 mejoraron el peso vivo, ganancia de peso, conversión alimenticia y eficiencia productiva. Los probióticos deben adherirse a la mucosa intestinal, colonizar y multiplicarse para producir enzimas, ácidos lácticos, vitaminas y antibióticos naturales; a su vez pueden excluir o reducir el crecimiento de patógenos por colonizar sitios favorables de adhesión (Haben 2019). Asimismo, los probióticos muestran una gran eficacia en promover el crecimiento animal, el cual es medido en base al aumento de peso diario, la eficiencia alimentaria y la mortalidad (Denli *et al.* 2003, Timmerman *et al.* 2006). Por tanto, según estos efectos positivos podríamos indicar que los microorganismos utilizados en la formulación probiótica lograron adherirse al intestino.

Una de las posibles razones de que no se manifieste diferencias al finalizar la crianza, podría deberse al esparcimiento de los microorganismos por todo el galpón ya que su adición en alimento fue de forma libre y por ende el efecto benéfico haya sido generalizado. Esto concuerda con los valores superiores en el peso de las aves a partir de la tercera semana (21 días) comparadas al manual de la Línea Cobb 500 (Cobb -Vantres 2018).

#### 4.2.2. Peso relativo de órganos

El promedio para el peso relativo de órganos digestivos (páncreas, hígado, peso y longitud de intestino) calculado como el porcentaje del peso corporal de pollos de carne a los 21 y 42 días se resumen en el Cuadro 23. No se encontró diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) en los pesos relativos de los órganos entre los seis tratamientos a los 21 y 42 días de edad del pollo.

**Cuadro 16: Peso relativo de órganos digestivos en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período / Órganos (% PV)	Tratamientos <sup>1</sup>						p-value
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
<b>A los 21 días de edad</b>							
Páncreas	0.34	0.34	0.31	0.33	0.34	0.31	0.6251
Hígado	2.77	2.95	2.84	2.96	2.93	2.72	0.4679
Peso de intestino	7.26	6.32	6.20	6.86	7.11	6.65	0.7295
Longitud de intestino	15.62	15.96	15.43	15.57	14.71	16.64	0.3452
<b>A los 42 días de edad</b>							
Páncreas	0.16	0.18	0.18	0.17	0.17	0.18	0.8351
Hígado	2.01	1.91	1.90	1.96	1.96	2	0.8975
Peso de intestino	4.52	4.24	4.27	4.63	4.45	4.11	0.6108
Longitud de intestino	6.38	6.18	6.41	6.16	6.30	5.83	0.3783

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I-C1 ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), T5: dieta con Fórmula Probiótica I-C2 ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), T6: dieta con Fórmula Probiótica I-C3 ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g).

Se observa un descenso del peso relativo de los órganos, incluyendo la longitud del intestino, de los 21 a los 42 días de edad, en todos los tratamientos. Esto se debe a que el pollito presenta dos fases, la primera en la que crece y la siguiente en la que engorda; dándose el máximo crecimiento (peso absoluto y relativo) de órganos inmunes y digestivos hasta los días nueve y diez (Martínez *et al.* 2021).

La suplementación en pollos de carne con el probiótico a base de tres cepas de actinomicetos, independientemente de la concentración, no causó ningún efecto en los pesos relativos de páncreas, hígado e intestino a los 21 y 42 días de edad. Asimismo, Martínez *et al.* (2019) tampoco reportan diferencias significativas entre un grupo de aves alimentadas con *Streptomyces* RL8 y un grupo control no tratado para el peso relativo del hígado e intestino a los 21 días de edad. En otros estudios similares, Olnood *et al.* (2015) no reportaron diferencias estadísticas para el peso relativo de hígado y páncreas a los 21 y 35 días suplementando con *Lactobacillus sp.* y los grupos control. También, Shokryazdan *et al.*

(2017) utilizando una mezcla de cepas de *Lactobacillus salivarius* (0.5 g/kg y 1 g/kg de alimento) como probiótico, no encontraron diferencias estadísticas en los pesos relativos del hígado y páncreas a los 21 y 42 días de edad frente a un grupo de aves que recibieron una dieta control.

Hallazgos similares se reportan por otros autores; un probiótico comercial adicionado en 1% por tonelada de alimento (Shahir *et al.* 2014), la adición de *Bacillus subtilis* en distintas concentraciones ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC/g) (Park y Kim 2014), con un consorcio de ocho bacterias como probiótico ( $2 \times 10^9$  UFC/g) en dosis de 500 g/TM (Srinivas *et al.* 2018), con la inclusión de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* ( $1 \times 10^9$  UFC/g) a 0.5g/Kg de alimento (Zaghari *et al.* 2020) no reportaron diferencias estadísticas con el grupo control sobre el peso relativo del hígado a los 42 días. Tenemos también a Kalavathy *et al.* (2003), Willis y Reid (2008), Awad *et al.* (2009), Jwher *et al.* (2013), Park y Kim (2014) quienes suplementando con probióticos no influyeron en el peso de los órganos comparados con el control hasta los 42 días.

Por otro lado, Awad *et al.* (2009) y Gorozabel *et al.* (2020) presentaron un mayor valor significativo ( $p < 0.05$ ) en el peso relativo del hígado en pollos, que recibieron un probiótico a base de cepas *Lactobacillus sp* en alimento y agua de bebida, respectivamente, comparadas a un grupo control a los 42 días de edad. Asimismo, Chávez *et al.* (2016) reporta pesos relativos mayores significativos ( $p < 0.05$ ) para páncreas, hígado e intestino que recibieron *Enterococcus faecium* en el agua de bebida a una concentración de  $10^7$  UFC/ml respecto del grupo control y grupo que recibió un antibiótico a los 42 días. Además, Fernandes *et al.* (2014) reportó un incremento en el peso relativo del intestino con un consorcio de bacterias ( $10^7$  UFC/g) a 150g/TM de alimento en comparación de los grupos control. También, Olnood *et al.* (2015) indicó que el peso relativo (al peso corporal) del páncreas incrementó significativamente por la adición de *Lactobacillus johnsonii* administrado por diferentes vías de entrega. A ello se suma Sjöfjan *et al.* (2021), observaron que la suplementación de probióticos en la dieta de pollos de engorde incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) el peso relativo del hígado.

Ante estos resultados de incremento en el peso relativo de órganos con el uso de probióticos, Alkhalaf *et al.* (2010), indican que su inclusión en la dieta de pollos de carne permite el rápido desarrollo de las bacterias benéficas en el tracto digestivo, generando una mejora en el ambiente intestinal y aumentando la eficiencia de los procesos de digestión y absorción de nutrientes, estos se reflejan en las ganancias de peso y por ende en el desarrollo de los órganos.

En el caso del hígado, un peso superior es considerado como un indicador positivo que se asocia a una mayor actividad metabólica (los nutrientes se sintetizan o almacenan en el hígado y luego se transportan en el plasma a los sitios de almacenamiento), su rol es importante en la digestión y el metabolismo regulando la síntesis, almacenamiento y liberación de carbohidratos, lípidos y proteínas; sin embargo, un hígado más grande con mayor actividad metabólica también puede generar un mayor gasto energético (Zaefarian *et al.* 2019).

Respecto al intestino, Bozkurt *et al.* (2012) indican que un incremento en el peso del intestino puede deberse a un engrosamiento de la pared intestinal asociado a condiciones desfavorables como el nivel de suplementación dietética baja que conlleva a un decremento en la ganancia de peso. Asimismo, el peso del intestino puede relacionarse con el largo del tal. Por lo que, algunos autores, han demostrado que la mejora en el peso relativo del intestino por la suplementación con probióticos en la dieta, se correlaciona con cambios morfométricos histológicos favorables, mejor superficie de absorción y disminución de bacterias patógenas (Awad *et al.* 2009, Tellez *et al.* 2010).

En la presente investigación, la suplementación con la mezcla de cepas de actinomicetos en distintas concentraciones no generó ningún efecto que difiera con los otros grupos en estudio, indicando un desarrollo normal e igual que los otros grupos sobre los órganos digestivos.

### 4.2.3. Inmunocompetencia

Los resultados para los indicadores de la inmunocompetencia (índice morfométrico de órganos linfoides y relación de bursa/bazo) de los pollos a los 21 y 42 días se resumen en el Cuadro 17. Las mediciones morfométricas de bursa, bazo y timo, diámetro de bursa y relación de bursa/bazo no mostraron diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos tanto a los 21 y 42 días de edad.

**Cuadro 17: Índice morfométrico de órganos linfoides y relación de bursa/bazo en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período / Medición	Tratamientos <sup>1</sup>						p-value
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
<b>A los 21 días de edad</b>							
Bursa (%)	1.99	1.74	2.29	2.16	2.17	2.04	0.3015
Bazo (%)	1.05	0.90	0.93	1.11	1.03	1.07	0.7185
Timo (%)	5.24	4.92	5.09	5.19	5.56	6.39	0.2227
Bursa/Bazo	2.10	2.09	2.61	2.12	2.23	2.07	-
Ø Bursa (cm)	5.75	5.25	5.63	5.88	5.88	5.75	0.3377
<b>A los 42 días de edad</b>							
Bursa (%)	1.76	1.48	1.69	1.87	1.78	1.60	0.5946
Bazo (%)	1.12	1	1.22	1.08	1.08	1.25	0.4202
Timo (%)	3.44	3.25	3.45	3.30	4.37	4.02	0.3588
Bursa/Bazo	1.59	1.56	1.42	1.79	1.74	1.29	-
Ø Bursa (cm)	7.63	7.63	7.13	7.50	7.38	7.13	0.4826

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I-C1 ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), T5: dieta con Fórmula Probiótica I-C2 ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), T6: dieta con Fórmula Probiótica I-C3 ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g).

Se observa un descenso del peso relativo de bursa y timo de los 21 a los 42 días de edad, sea cual fuere el tratamiento. Esto coincide con Tambini *et al.* (2010) quienes encontraron que los pollos Ross a los 42 días disminuían en el peso relativo de estos órganos siendo explicado por el acelerado crecimiento en las dos últimas semanas de los pollos de carne. Según Giambrone (1996), el peso relativo de la bursa está relacionada con la inmunosupresión; aves de 21 a 42 días de edad tienen normalmente un índice morfométrico (peso relativo) de 2 a 4; mientras, índices menores o igual a uno nos indica inmunosupresión.

Asimismo, Cazaban *et al.* (2015) proponen que tener una relación mayor o igual a 1.1, es ideal para aves sanas. Por tanto, se observa que las aves experimentales se encuentran dentro del rango, superior a 1.1, caracterizándolas como aves sanas.

Mientras el peso relativo del bazo tiene un ligero incremento al pasar las semanas (de 21 a 42 días de edad); estos resultados concuerdan con Perozo *et al.* (2004) y Tambini *et al.* (2010) quienes indican que existe una relación proporcional entre el tamaño del bazo y el peso corporal. Por tanto, es normal los resultados obtenidos ya que los pollos a los 42 días tienen un peso superior a 3 kg.

Hubo un descenso en la relación de bursa y bazo al día 42 respecto del 21; el tamaño de la bursa es mayor que el bazo hasta los 30 o 35 días de edad como sugieren (Pulido *et al.* 2001, Perozo *et al.* 2004). Esto se debe a la involución de la bursa que se desarrolla después de los 35 días de edad (Krasnikov *et al.* 2006 y Ribatti *et al.* 2006).

La suplementación con el probiótico a base de tres cepas de actinomicetos en distintas concentraciones no generó ningún efecto significativo en la morfometría de los órganos linfoides a los 21 y 42 días de edad. Estos resultados concuerdan con Martínez *et al.* (2019) quienes tampoco encontraron diferencias significativas para el peso relativo del bazo en pollos de 21 días de edad, que fueron alimentados con *Streptomyces* RL8 como probiótico. Asimismo, Awad *et al.* (2009) no reportaron diferencias estadísticas para bursa y timo, pero sí para bazo (valor superior significativo) entre aves suplementadas con 1kg/TM de *Lactobacillus* ( $1 \times 10^5$  UFC/g) respecto del control a los 35 días de edad. Asimismo, Shokryazdan *et al.* (2017) con el uso de *Lactobacillus salivarius* (CI1, CI2 and CI3) como probiótico no reportaron diferencias significativas sobre los pesos relativos de bazo y bursa a los 21 y 42 días de edad.

Otros autores han reportado también que no hay efecto con la suplementación de probióticos, administrado por diferentes vías de entrega, sobre órganos linfoides (Ahmadi 2011, Naseem *et al.* 2012, Shahir *et al.* 2014, Olnood *et al.* 2015, Pourakbari *et al.* 2016).

Por otro lado, Karimi *et al.* (2010) quienes evaluaron el efecto de la administración de un consorcio de microorganismo como probiótico (*Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* y *Candida pintolopesii*) en agua y alimento sobre la respuesta inmunitaria, reportaron que el peso relativo de bazo y bursa fue

influenciado positivamente por la administración de probióticos a los 42 días de edad de las aves. Asimismo, Shirisha *et al.* (2017) reportaron que la suplementación con probiótico (100 g/TM) no genera diferencias significativas con un grupo control y grupos donde recibieron el mismo probiótico con dosis mayores sobre el peso relativo de timo y bazo, pero sí en el peso relativo de la bursa. También, Sjöfjan *et al.* (2021) reportó que la suplementación de probióticos en la dieta de pollos de engorde incremento significativamente ( $p < 0,001$ ) el peso del bazo y bursa.

Frente al incremento del peso relativo de los órganos linfoides; Gore y Qureshi (1997), Cadena y Jauregui (2016) y Senthilkumar *et al.* (2018) indican que aves con mayor tamaño de estos órganos (bursa, timo y bazo) tienen una mejor respuesta contra los agentes infecciosos debido a que en estos órganos se da lugar la formación de agentes del sistema inmunológico, principalmente durante sus primeros días de vida. Sin embargo, Martínez *et al.* (2013) indica que un mayor peso relativo de los órganos inmunes podría reducir el peso corporal en pollos debido a un aumento en el gasto energético para la producción de células inmunes.

Además, Awad *et al.* (2006) y Puvadolpirod y Thaxton (2000) consideran que el peso relativo del bazo, timo y bursa disminuyen como consecuencia de la exposición en las aves a factores estresantes (agentes inmunosupresores). En la presente investigación, la suplementación con la mezcla de cepas de actinomicetos en distintas concentraciones no generó incrementos ni decrementos significativos respecto a los grupos control, indicando un desarrollo normal e igual que los otros grupos en los órganos linfoides.

#### 4.2.4. Integridad intestinal

##### 4.2.4.1. Evaluación macroscópica

Los indicadores de la evaluación macroscópica de la integridad intestinal de los pollos Cobb, a los 21 y 42 días de edad, según la ausencia (0) y presencia (1) del pasaje de alimento, descamación celular, exceso de moco, exceso de fluido, hiperemia y gases se resumen en el Cuadro 18.

A los 21 y 42 días, ninguno de los indicadores mostró diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos; por otro lado, no hubo presencia de gases en ninguno de los tratamientos. La presentación de los indicadores evaluados macroscópicamente fue creciente según la edad de las aves. Estos indicadores permiten conocer el problema de salud intestinal llamado disbacteriosis (llamado también Enteritis bacteriana o sobre crecimiento bacteriano del intestino delgado) definido como la presencia de microbiota anormal en las partes proximales del intestino (Fabri 2000, De Gussem 2007). Mientras, Smits (2001) lo considera como un desequilibrio microbiano donde se dan cambios en el número y composición de bacterias intestinales no patógenas que pueden originar perturbaciones digestivas. La puntuación de la disbacteriosis se realiza de acuerdo con el sistema descrito por De Gussem (2010) y Teirlynck *et al.* (2011); evaluando en el intestino parámetros individuales que se puntúan como presente (1) o no presente (0).

De acuerdo con la puntuación encontrada, a los 21 días de edad los grupos de aves T4 (concentración menor de la fórmula probiótica I), T1 (dieta control) y T3 (dieta con *Bacillus subtilis*) son consideradas como aves en buen estado y libres de disbacteriosis; mientras, los resultados para los indicadores de parámetros productivos a esas edad favorecen significativamente ( $p < 0.05$ ) a los T3 (dieta con *Bacillus subtilis*), T5 (concentración media de la Fórmula Probiótica I) y T6 (concentración alta de la Fórmula Probiótica I) en peso corporal, ganancia acumulada de peso, conversión alimenticia y eficiencia productivo europea.

Por otro lado, a los 42 días de edad, todos los grupos de aves superaron la puntuación mínima. Sin embargo, los resultados para los indicadores de parámetros productivos a esa edad favorecen significativamente ( $p < 0.05$ ) la conversión alimenticia para los grupos de aves que recibieron probióticos, y para el índice de eficiencia productivo europea solo el grupo T4 (baja concentración de la Fórmula Probiótica I).



**Cuadro 18: Indicadores de la evaluación macroscópica de la integridad intestinal en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Período / Medidas	Tratamientos <sup>1</sup> (n=8)						p-value
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
<b>A los 21 días de edad</b>							
Pasaje de alimento	0.25 (2/8)	0.13 (1/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0.13 (1/8)	0.25 (2/8)	0.4831
Descamación celular	0.75 (6/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	0.0693
Exceso de moco	0.63 (5/8)	0.38 (3/8)	0.63 (5/8)	0.50 (4/8)	0.50 (4/8)	0.63 (5/8)	0.8960
Exceso de fluido	0 (0/8)	0.25 (2/8)	0.13 (1/8)	0.25 (2/8)	0.38 (3/8)	0.25 (2/8)	0.5555
Hiperemia	0.25 (2/8)	0.38 (3/8)	0.13 (1/8)	0.50 (4/8)	0.38 (3/8)	0.50 (4/8)	0.5998
Gases	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	-
<b>A los 42 días de edad</b>							
Pasaje de alimento	0.38 (3/8)	0.38 (3/8)	0.38 (3/8)	0.50 (4/8)	0.38 (3/8)	0.25 (2/8)	0.9589
Descamación celular	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	1 (8/8)	0 (0/8)	1 (8/8)	0.4159
Exceso de moco	0.75 (6/8)	0.75 (6/8)	0.63 (5/8)	0.88 (7/8)	0.75 (6/8)	0.63 (5/8)	0.8818
Exceso de fluido	0.25 (2/8)	0.63 (5/8)	0.13 (1/8)	0.38 (3/8)	0.50 (4/8)	0.13 (1/8)	0.1963
Hiperemia	0.38 (3/8)	0.50 (4/8)	0.63 (5/8)	0.25 (2/8)	0.75 (6/8)	0.50 (4/8)	0.4287
Gases	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	-

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I-C1 ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), T5: dieta con Fórmula Probiótica I-C2 ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), T6: dieta con Fórmula Probiótica I-C3 ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g).

En el caso del grupo T2, quien recibió el antibiótico promotor de crecimiento, tanto a los 21 y 42 días de edad manifiesta disbacteriosis, conllevando a tener los más bajos valores significativamente ( $p < 0.05$ ) en conversión alimenticia e índice de eficiencia productivo europea a los 21 y 42 días; esto concuerda con Further (2005), quien encontró que factores exógenos diversos como el uso de antibióticos provocan la ruptura del equilibrio intestinal y todo el sistema digestivo se ve afectado en mayor o menor grado.

Por otro lado, la evaluación del score de lesiones intestinales macroscópicas causada por patógenos intestinales es presentada en el Cuadro 19. A los 21 días, realizada la evaluación no se observa lesiones por *Clostridium perfringens*; por otro lado, el score de lesiones por Eimerias no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos, cuya calificación promedio no supera +2. Esto indicaría que todos los grupos de aves presentaron lesiones moderadas. Asimismo, considerando la puntuación máxima de 1 para considerar en buen estado (Johnson y Reid 1970), solo el grupo T2 (dieta con APC) obtuvo el valor.

A los 42 días, no se observa lesiones causadas por *Eimeria acervulina* y *Clostridium perfringens*; mientras, el score de lesiones por *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella* no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos, cuya calificación promedio no supera a +1. Esto indicaría que las aves presentaron lesiones leves.

Respecto al efecto de la adición de un probiótico en dietas de pollos para el control de coccidias, Dalloul *et al.* (2003), indican que los probióticos actúan como inmunomoduladores que tienen acción en el sistema inmune de mucosas (local) ante la infección con coccidios, aumentando la resistencia, siendo demostrada por medio de la disminución en la eliminación de oocistos en la materia fecal del huésped. Asimismo, Kyung-Woo *et al.* (2010) han comprobado las propiedades inmunomoduladoras de la cepa *B. subtilis* en la coccidiosis aviar al reducir los signos clínicos de la enfermedad; conduciendo a la mejora de la respuesta inmunitaria protectora y biosíntesis de péptidos antimicrobianos endógenos.

En la presente investigación, los probióticos a base de actinomicetos cualquiera sea su concentración no generó ningún impacto positivo contra los parásitos intestinales respecto de los otros tratamientos.

**Cuadro 19: Lesiones por parásitos intestinales en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación de probióticos**

Período / Medidas	Tratamientos <sup>1</sup>					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
A los 21 días de edad						
Lesiones por <i>Eimeria acervulina</i>	1	0.50	1.50	1.75	1.50	1.75
Lesiones por <i>Eimeria maxima</i>	0.63	0.13	0.50	1	1.25	1.38
Lesiones por <i>Eimeria tenella</i>	0.63	0.38	0.25	0.25	0.25	0.38
Lesiones por <i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	0	0	0
A los 42 días de edad						
Lesiones por <i>Eimeria acervulina</i>	0	0	0	0	0	0
Lesiones por <i>Eimeria maxima</i>	0.50	0.50	0.50	0.63	0.25	0.38
Lesiones por <i>Eimeria tenella</i>	0.13	0.63	0	0.13	0.13	0.13
Lesiones por <i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I-C1 ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), T5: dieta con Fórmula Probiótica I-C2 ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g), T6: dieta con Fórmula Probiótica I-C3 ( $10^{16} - 10^{20}$  UFC/g).

#### 4.2.4.2. Histomorfometría intestinal

Los promedios para los indicadores de la histomorfometría intestinal de las porciones tanto del duodeno y del yeyuno (altura y ancho de la vellosidad, profundidad de cripta e índice intestinal) se resumen en el Cuadro 20. La altura de la vellosidad y profundidad de cripta del duodeno a los 21 días de edad, altura de la vellosidad del yeyuno e índice intestinal del duodeno a los 42 días de edad mostraron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

A los 21 días de edad, la altura de la vellosidad en el duodeno presentó un valor superior en los grupos T5 y T6 que fueron suplementados con probióticos a base de actinomicetos, pero solo el primer grupo es estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los demás grupos T1, T2, T3 y T4. De acuerdo con Nitsan *et al.* (1991), Caspary (1992) y Roa *et al.* (2018), una mayor altura y ancho de vellosidades podría mejorar la absorción de nutrientes y por consiguiente la salud de animales. Esto concuerda con los mejores parámetros productivos obtenidos a los 21 días, siendo los grupos T5 y T6 (media y alta concentración de la Fórmula Probiótica I, respectivamente) los que obtuvieron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el peso, ganancia de peso e índice de eficiencia productivo europea, y decremento en la conversión alimenticia. Sin embargo, no incrementó el crecimiento del intestino (respecto al peso corporal); contrastando con Nitsan *et al.* (1991), quienes indican que el incremento en las vellosidades tiene un efecto en el crecimiento del intestino.

Respecto a la profundidad de cripta en el duodeno, a los 21 días, presentó un menor valor para los grupos T2, T3 y T4, los cuales se diferencian estadísticamente ( $p < 0.05$ ) de los grupos T1 y T5. Una menor profundidad de cripta es una característica deseada en la producción animal (Potten 1998); criptas más profundas (valores mayores) indican una rápida rotación del tejido para renovar vellosidades, la cual se da en respuesta a procesos de inflamación debidos a patógenos o sus toxinas (Yason *et al.* 1987, Anonymous 1999). Por tanto, tanto el grupo T1 (dieta control) y T5 (concentración media de la Fórmula Probiótica I) estarían en un proceso inflamatorio; sin embargo, el grupo T5 a pesar de ello, muestra parámetros productivos óptimos a esa edad.

Otros autores reportan como Sen *et al.* (2012) quienes utilizaron *Bacillus subtilis* en dosis de 0.15, 0.30 y 0.45% en el alimento obtuvieron un mayor valor significativo ( $p < 0.05$ ) en el índice intestinal a nivel del duodeno respecto al grupo control a los 35 días de edad; Shokryazdan *et al.* (2017) no registraron diferencias entre las aves suplementadas con probióticos a base de cepas *Lactobacillus salivarius* y las aves del grupo control a los 21 días de edad.

A los 42 días de edad, la altura de la vellosidad en el yeyuno mostró un valor superior estadísticamente ( $p < 0.05$ ) en el grupo T6 suplementado con una alta concentración del probiótico a base de actinomicetos; mientras, el T2 que recibió el antibiótico promotor de crecimiento mostró un valor inferior respecto a los demás tratamientos. Resultados similares son reportados por otros autores, con la adición de 0.1% de un consorcio de bacterias (probiótico comercial,  $6 \times 10^7$  UFC/g) sobre el alimento (Gunal *et al.* 2006), con el consumo de *Bacillus subtilis* PB6 como probiótico (Chen *et al.* 2019), *Lactobacillus* (Ashraf *et al.*, 2013), consorcio de bacterias (Kazemi *et al.* 2019) incrementaron la altura de la vellosidad a nivel de yeyuno diferenciándose estadísticamente con el grupo control y grupo que recibió un antibiótico a los 42 días de edad. Por otro lado, estudios como el de Souza *et al.* (2018) y Li *et al.* (2019) no encontraron diferencias significativas para la altura de vellosidades intestinales entre grupos que recibieron probióticos y grupos control que recibieron dietas basales a los 42 días.

Respecto al índice intestinal en el duodeno, a los 42 días, se presentó mejores valores estadísticamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos T5 y T6, los cuales recibieron en la dieta el probiótico a base de actinomicetos, respectivamente; mientras el T2 que recibió el antibiótico promotor de crecimiento presentó el menor valor. Asimismo, Awad *et al.* (2009) al suplementar con *Lactobacillus* mostraron diferencias significativas favorables para el índice intestinal respecto al control a los 35 días de edad. En contraste, Chen *et al.* (2019) no reportó diferencias para el índice intestinal a nivel de duodeno con la adición de *Bacillus subtilis* PB6 ( $1 \times 10^6$  UFC/g) como probiótico a los 42 días.

Samanya y Yamauchi (2002) proponen que los probióticos aumentan la longitud de las vellosidades activando la mitosis celular e inducen la proliferación de células epiteliales intestinales; este aumento en la altura de las vellosidades por los probióticos es beneficioso para los pollos de engorde, ya que el aumento de la superficie de las vellosidades mejora la absorción de nutrientes. Asimismo, el índice intestinal está asociado a la eficiencia de

crecimiento y la superficie de absorción de nutrientes; por tanto, un bajo índice intestinal indicaría una mayor tasa de renovación celular pero insuficiente para incrementar el tamaño de las vellosidades (Awad *et al.* 2009, Clevers 2013). En este sentido, se puede resaltar una posible relación entre un alto índice intestinal y mejor resultado ( $p < 0.05$ ) en la conversión alimenticia a los 42 días de edad de las aves suplementadas con el consorcio de actinomicetos en los grupos T5 y T6 (media y alta concentración, respectivamente).

Por otro lado, se ha sugerido que la alteración en la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas puede conducir a una mala absorción de nutrientes, secreción de enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal y eventualmente a un menor crecimiento en los pollos de engorde (Singh *et al.* 2011). Asimismo, se ha informado mucho sobre las lesiones de las paredes intestinales tras la administración de antibióticos, y muy a menudo van acompañadas de adelgazamiento de la capa de moco y alto decremento de las células caliciformes (Wlodarska *et al.* 2011). De acuerdo con esto, el grupo T2 que recibió el antibiótico promotor de crecimiento, obtuvo una desfavorable conversión alimenticia y menor índice de eficiencia productivo europea, así como un menor valor significativo ( $p < 0.05$ ) en la altura de vellosidad de yeyuno e índice intestinal de duodeno.

**Cuadro 20: Histomorfometría intestinal en pollos de carne de la línea Cobb 500 a los 21 y 42 días de edad en respuesta a la suplementación con probióticos**

Periodo / Medidas	Segmento del intestino	Tratamiento <sup>1</sup>					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
<b>A los 21 días</b>							
Altura de vellosidad (um)	Duodeno	1860.80 <sup>bc</sup>	1807.25 <sup>bc</sup>	1848.85 <sup>bc</sup>	1794.58 <sup>c</sup>	1978.56 <sup>a</sup>	1925.50 <sup>ab</sup>
	Yeyuno	1186.19	1127.58	1136.08	1059.94	1173.13	1165.06
Profundidad de cripta (um)	Duodeno	279.35 <sup>a</sup>	241.30 <sup>b</sup>	240.75 <sup>b</sup>	235.20 <sup>b</sup>	280.45 <sup>a</sup>	252.98 <sup>ab</sup>
	Yeyuno	223.29	196.89	202.91	193.54	245.35	224.43
Ancho de vellosidad (um)	Duodeno	159.91	155.49	153.35	173.32	143.04	147.22
	Yeyuno	151.38	147.10	143.60	151.77	137.29	134.33
Índice intestinal (um/ um)	Duodeno	6.76	7.60	7.71	7.82	7.13	7.68
	Yeyuno	5.32	5.76	5.72	5.51	4.86	5.45
<b>A los 42 días</b>							
Altura de vellosidad (um)	Duodeno	1766.98	1741.93	1751.41	1948.58	1875.85	1859.05
	Yeyuno	1100.08 <sup>ab</sup>	1044.20 <sup>b</sup>	1191.85 <sup>ab</sup>	1192.90 <sup>ab</sup>	1176.98 <sup>ab</sup>	1233.48 <sup>a</sup>
Profundidad de cripta (um)	Duodeno	256.04	279.28	243.58	272.30	235.53	240.30
	Yeyuno	183.28	184.73	209.43	206.75	200.88	234.43
Ancho de vellosidad (um)	Duodeno	136.67	148.65	137.14	146.63	137.53	141.90
	Yeyuno	147.10	149.75	139.25	136.08	135.85	137.08
Índice intestinal (um/ um)	Duodeno	6.98 <sup>ab</sup>	6.26 <sup>b</sup>	7.25 <sup>ab</sup>	7.17 <sup>ab</sup>	8 <sup>a</sup>	7.76 <sup>a</sup>
	Yeyuno	6.03	5.70	5.76	5.79	5.90	5.39

<sup>1</sup>T1: dieta control, T2: dieta con antibiótico promotor de crecimiento, T3: dieta con *Bacillus subtilis*, T4: dieta con Fórmula Probiótica I-C1(10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> UFC/g), T5: dieta con Fórmula Probiótica I-C2 (10<sup>8</sup> - 10<sup>10</sup> UFC/g), T6: dieta con Fórmula Probiótica I-C3 (10<sup>16</sup> - 10<sup>20</sup> UFC/g).

<sup>a, b, c</sup> Valores dentro de una fila con superíndice no común difieren significativamente (p<0.05).

#### 4.3. ESTUDIO III – CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ACTINOMICETOS

Las cepas bacterianas denominadas como P004, P009 y P025 de la Fórmula Probiótica I, seleccionada y utilizada en la experimentación *in vivo* en pollos de carne, para su identificación molecular, pasaron por procesos de extracción del ADN, amplificación por PCR, electroforesis en gel de agarosa, purificación, secuenciación y análisis bioinformático.

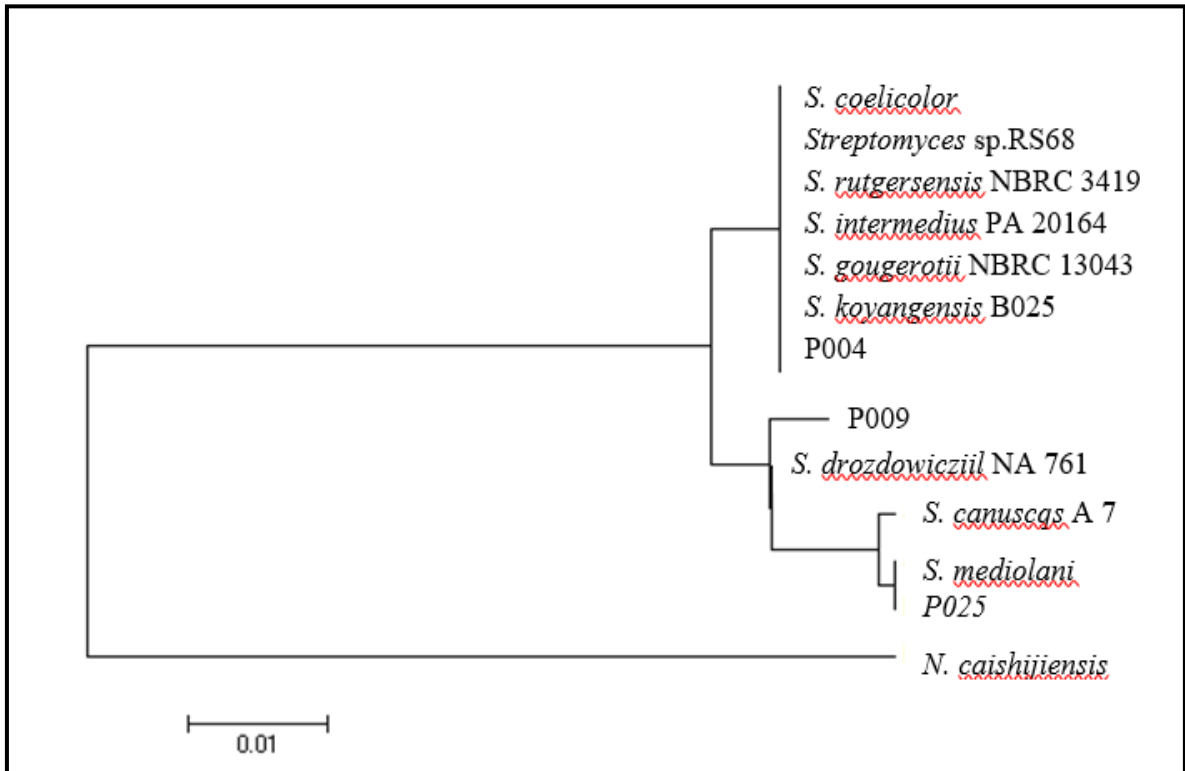
Se logró identificar a las cepas como miembros del género *Streptomyces spp.*, a través del análisis de las secuencias de la región hipervariable V3-V4 ubicadas dentro de la región  $\gamma$  del ADNr 16S, dichas regiones mostradas en el Cuadro 21, permitió mediante un primer análisis BLAST identificar estas bacterias como pertenecientes a este género. Este resultado corrobora lo indicado por Ramos (2019), quien caracterizó fenotípicamente estas cepas; siendo una identificación convencional de *Streptomyces* basada en estudios morfológicos y microscópicos, particularmente la pigmentación soluble en los medios de cultivo y además de las características fisiológicas, aunque suelen variar con los nutrientes disponibles y condiciones físicas donde se desarrollan.

Con la finalidad de verificar el grado de parentesco y agrupación con especies representativas del género, realizamos un análisis filogenético, alineando las secuencias de las especies no identificadas, con las secuencias referenciales de especies tipo, conocidas y depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Así fue posible inferir la relación filogenética entre especies y su grupo taxonómico referencial o representativo.

El árbol filogenético (Figura 1) obtenido mediante el método de Neighbour -joining reveló que la cepa denominada P004 mostró estar relacionada en un 99% a *Streptomyces koyangensis* B025 según análisis BLAST, y se encuentra en un mismo clado demostrando estar también estrechamente emparentada con *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces sp.* RS68, *Streptomyces rutgersensis* NBRC 3419, *Streptomyces intermedius* PA20164, y *Streptomyces gougerotii* NBRC 13043.

Respecto a la cepa denominada como P009, ésta se encuentra relacionada a *Streptomyces drozdowiczii* NA761 con una homología de secuencia de 98.83% según análisis BLAST. Esta bacteria celulolítica fue descubierta en el 2004, desde el suelo del bosque de Mata Atlántica en Brasil.





**Figura 1.** Árbol filogenético consenso obtenido mediante el Método de Neighbour -joining (Bootstrap =1000) usando el alineamiento de las secuencias de la región hipervariable V3-V4 del gen ADNr 16S de las cepas de actinomicetos P004, P009 y P025. Grupo externo utilizado representado por *Nocardia caishijiensis*

Por otro lado, la cepa denominada P025 mostró estar estrechamente emparentada con la cepa *Streptomyces mediolani* EM-B2 y su secuencia según análisis BLAST presenta una homología de 100%. Esta bacteria fue aislada de un biodigestor productor de biogás por fermentación del estiércol de vaca.

Además, según nuestro árbol filogenético la cepa P009 y la P025 provendrían de un ancestro común, cuyas distancias probablemente estarían vinculadas con su grado de adaptación a este nicho ecológico inusual.

**Cuadro 21: Secuencia de la región hipervariable V3-V4 del gen ADNr 16S de la cepas**

16S ADNr P004

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
PIL01  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
      220      230      240      250      260      270      280      290      300
PIL01  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCG
      430      440      450
PIL01  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
  
```

Región hipervariable V3-V4 del gen ADNr 16S de la cepa P004, la cual se inicia en la posición de nucleótidos 260 al 710

16S ADNr P009

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
PIL02  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
      220      230      240      250      260      270      280      290      300
PIL02  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTGTG
      430      440      450
PIL02  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
  
```

Región hipervariable V3- V4 del gen ADNr 16S de la cepa P009, la cual se inicia en la posición de nucleótidos 271 al 721.

16S ADNr P025

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
PIL03  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
      220      230      240      250      260      270      280      290      300
PIL03  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTTGTG
      430      440      450
PIL03  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
  
```

Región hipervariable V3- V4 del gen ADNr 16S de la cepa P025, la cual se inicia en la posición de nucleótidos 272 al 7222.

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el presente estudio se concluye:

1. La Fórmula Probiótica I a base de actinomicetos aisladas del tracto digestivo de gallinas criollas mejora los parámetros productivos e integridad intestinal, específicamente, en peso vivo, ganancia de peso, altura de vellosidad de yeyuno y profundidad de cripta de duodeno, pero no tuvo influencia sobre el peso relativo de órganos digestivos (hígado, páncreas e intestino) e inmunocompetencia.
2. A una baja concentración,  $10^4$ - $10^5$  UFC/g, la Fórmula Probiótica I, aislada del tracto digestivo de gallinas criollas, mejoró el índice de eficiencias europea, pero no tuvo influencia sobre la integridad intestinal, peso relativo de órganos digestivos e inmunocompetencia.
3. Las cepas utilizadas como parte de la Fórmula Probiótica I, aisladas del tracto digestivo de gallinas criollas, al ser caracterizadas molecularmente demostraron pertenecer al género *Streptomyces*.

## **VI. RECOMENDACIONES**

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda:

1. Utilizar la Fórmula Probiótica I, aisladas del tracto digestivo de gallinas criollas, a una concentración de  $10^4 - 10^5$  UFC/g, como aditivo alternativo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación de pollos de carne.
2. Evaluar el efecto de la Fórmula Probiótica I, aisladas del tracto digestivo de gallinas criollas, sobre los parámetros productivos, peso de órganos, inmunocompetencia e integridad intestinal en condiciones de desafío bacteriano.
3. Caracterizar la microbiota intestinal de pollos alimentados con dietas que contienen la Fórmula Probiótica I, aisladas del tracto digestivo de gallinas criollas, en condiciones de crianzas normales.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, R; Capa, M; Herrera, V; Herrera, R; Escudero, G. 2017. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. *Centro de Biotecnología* 6: 98-108.
- Abdel-Raheem, S. M., & Abd-Allah, S. M. 2011. The effect of single or combined dietary supplementation of mannan oligosaccharide and probiotics on performance and slaughter characteristics of broilers. *Int. J. Poult. Sci*, 10(11), 854-862.
- Abudabos AM, Alyemni AH, Dafalla YM, Khan RU. 2017. Effect of organic acid blend and *Bacillus subtilis* alone or in combination on growth traits, blood biochemical and antioxidant status in broiler exposed to *Salmonella typhimurium* challenge during the starter phase. *J Appl Anim Res*. 45:538–542
- Acosta, A., Lon-Wo, E., García, Y., Dieppa, O. Febles, M. 2007. Effect of a probiotic mixture (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*) on the productive performance, carcass yield and economic indicators of broiler chickens. *Cuban Journal of Agricultural Science* 41(4):335.
- Adedokun, S. A., Olojede, O. C. 2019. Optimizing Gastrointestinal Integrity in Poultry: The Role of Nutrients and Feed Additives. *Frontiers in veterinary science*, 5(348):1-11. Doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00348>
- Aguavil, J. 2012. Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas. Proyecto de Investigación Ing. Agropecuario. Santo Domingo, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. 90 p.
- Ahmadi, F. 2011. The Effect of different levels of Virginiamycin on performance, immune organs and blood metabolite of broiler chickens. *Annals of Biological Research*, 25, 291-298.
- Alfaro, LE; Briceño, JV. 2013. Importancia de la Salud intestinal en las aves y diseño de programas anticoccidiales. Engormix.
- Alkhalif, A.; Alhaj, M.; Al-Homidan, I. 2010. Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi J. Biol. Sci*. 17(1):219-225.
- Allen, H.K., and Stanton, T.B. 2014. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. *Annual Review of Microbiology*, 68, 297-315
- Al-Sultan, S. I., Abdel-Raheem, S. M., El-Ghareeb, W. R., & Mohamed, M. H. 2016. Comparative effects of using prebiotic, probiotic, synbiotic and acidifier on growth performance, intestinal microbiology and histomorphology of broiler chicks. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 64(2), S187-S195.

- Alvo, A., Tellez, V., Sedano, C., Fica, A. 2016. Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v76n1/art19.pdf>
- Amerah, A. M., Quiles, A., Medel, P., Sánchez, J., Lehtinen, M. J., & Gracia, M. I. 2013. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 180(1-4), 55-63.
- Anderson RC, Stanker LH, Young CR, Buckley SA, Genovese KJ, Harvey RB, DeLoach JR, Keith NK & Nisbet DJ. 1999. Effect of competitive exclusion treatment on early colonization of earlyweaned pigs by *Salmonella* serovar Cholerasuis. *Swine Health Prod.* 7: 155–160.
- Anonymous. 1999. How do mannanoligosaccharides work? *Feeding Times* 1, 7–9.
- Anwar, H., Rahman, Z., Javed, I., & Muhammad, F. 2012. Efficacy of protein, symbiotic and probiotic supplementation on body performance and organs weight in molted layers. *Pak Vet J*, 33, 117-119.
- Apajalahti, J and Kettunen, A. 2006. Microbes of the chicken gastrointestinal tract. *Aviangut*, 124-137.
- Apata, D. F. 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1253-1258.
- Ardoino, S. M., Toso, R. E., Alvarez, H. L., Mariani, E. L., Cachau, P. D., Mancilla, M. V., Oriani, D. S. 2018. Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. *Ciencia Veterinaria* 19(1): 50-66.
- Arevalo. 2016. Efecto de la enterogermina (Esporas de *Bacillus clausii*) en comportamiento productivo de pollos de engorde. (Tesis de graduación) Tungurahua- Ecuador. Universidad técnica de Ambato. Cevallos, 32
- Arteaga, F., Rondón, A., Milián, G., Laurencio, M., Narváez, G., Velez, L. A., ... & Muñoz, J. (2020). Effect of a probiotic mixture of *Bacillus subtilis* 20Bp and *Lactobacillus brevis* 40Lp on productive and health indicators of broilers. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1).
- Ashraf, S., Zaneb, H., Yousaf, M. S., Ijaz, A., Sohail, M. U., Muti, S., ... & Rehman, H. 2013. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97, 68-73.
- Aviapp. 2020. Scoring guide version 3.5. Recuperado de [https://aviapp.huvepharma.com/assets/Aviapp\\_Scoring\\_Guide.pdf](https://aviapp.huvepharma.com/assets/Aviapp_Scoring_Guide.pdf)
- Awad, W. A., Böhm, J., Razzazi-Fazeli, E., Ghareeb, K., & Zentek, J. 2006. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poultry science*, 85(6), 974-979.

- Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry science*, 88(1), 49-56.
- Azizpour, K; Bahrambeygi, S; Mahmoodpour, S; Azizpour, A; Mahmoodpour, S; Bahrambeygi, S; Azizpour, K. 2009. History and Basic of Probiotics. *Research Journal of Biological Sciences*, 4: 409-426.
- Bai SP, Wu AM, Ding XM, Lei Y, Bai J, Zhang KY, Chio JS. 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult Sci* 92(3):663-70. doi: <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02813>
- Bailey, R. 2013. Salud intestinal en aves domésticas - El mundo interior. Aviagen, 1-12. Recuperado de <https://docplayer.es/1793142-Aviagenbrief-sintesis-salud-intestinal-en-aves-domesticas-el-mundo-interno-aviagen-brief-optimizing-broiler-fcr-june-2011.html>
- Bailey, R. 2019. Gut Health in Poultry – The World Within: Update. *Arbor Acres Service Bulletin*, 1-10.
- Batista de Oliveira P., Murakami A.E., De Moraes Garcia, E.R., Macari M., Scapinello C. 2000. Influence of antinutritional factors of leucaena (*Leucaena leucocephala* and *Leucaena cunninghamii*) and pigeon bean (*Cajanus cajan*) on the intestinal epithelium and performance of broiler chickens. *Rev Bras Zootec* 29: 1759-1769.
- Bedford MR. 2000. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *W. Poult. Sci. J.* 56: 347-365.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* 58(1): 1-26.
- Berdy, J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*, 65, 385-395
- Berglund, B. 2015. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection ecology & epidemiology*, 5(1), 28564.
- Bhogoju, S., Khwatenge, C. N., Taylor-Bowden, T., Akerele, G., Kimathi, B. M., Donkor, J., & Nahashon, S. N. 2021. Effects of *Lactobacillus reuteri* and *Streptomyces coelicolor* on Growth Performance of Broiler Chickens. *Microorganisms*, 9(6), 1341.
- Bischoff, S. C. 2011. 'Gut health': a new objective in medicine?. *BMC medicine*, 9(1), 1-14.
- Blajman, JE; Zbrun, MV; Astesana, DM; Berisvil, AP; Scharpen, AR; Fusari, ML; Frizzo, LS. 2015. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista argentina de microbiología* 47(4):360-367.
- Bozkurt, M., Küçükyılmaz, K., Uğur Çatli, A., Özyıldız, Z., Çınar, M., Çabuk, M., & Çöven, F. 2012. Influences of an essential oil mixture supplementation to corn versus wheat-based practical diets on growth, organ size, intestinal morphology and immune response of male and female broilers. *Italian Journal of Animal Science*, 11(3), e54.

- Brisbin, J. T., Gong, J., Orouji, S., Esufali, J., Mallick, A. I., Parvizi, P., ... & Sharif, S. 2011. Oral treatment of chickens with lactobacilli influences elicitation of immune responses. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(9), 1447-1455.
- Brozca, F., Grybusky, R., Stecka, K. & Prieska, M. 2000. Effect of two probiotics vs antibiotics on chicken broiler body weight carcass yield and carcass quality. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 27:303
- Bun, S. D., Guo, Y. M., Guo, F. C., Ji, F. J., & Cao, H. 2011. Influence of organic zinc supplementation on the antioxidant status and immune responses of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poultry Science*, 90(6):1220-1226. Doi: <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01308>
- Cadena, V. A. & Jauregui, D. J. 2016. El propóleo en la morfometría linfoidea y control bacteriano en pollos camperos. *REVISTA CIENTÍFICA AXIOMA*, (15), 16-25.
- Cai, L., L. Ye, A. H. Y. Tong, S. Lok, and T. Zhang. 2013. Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PLoS One*. 8:e53649.
- Calik A, Omara II, White MB, Li W and Dalloul RA (2019) Effects of Dietary Direct Fed Microbial Supplementation on Performance, Intestinal Morphology and Immune Response of Broiler Chickens Challenged With Coccidiosis. *Front. Vet. Sci.* 6:463. doi: 10.3389/fvets.2019.00463
- Calle, L. 2011. Efecto de un Simbiótico y un Probiótico en el crecimiento y engorde de pollos Broiler. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Laja. Laja, Ecuador.
- Calvo, A. 2004. La resistencia bacteriana a los antibióticos. *Exopol. Circular* 215.
- Cao, G.T.; Zeng, X.F.; Chen, A.G.; Zhou, L.; Zhang, L.; Xiao, Y.P. Yang, C.M. 2013. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult Sci* 92: 2949-2955.
- Carvalho, I. T. & Santos, L. 2016. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment international*, 94, 736-757.
- Caspary, W.F. 1992. Physiology and Pathophysiology of Intestinal Absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 299S-308S
- Castro J; Chirinos D. 2008. Manual de formulación de raciones balanceadas para animales. Lima: CONCY-TEC. 230
- Cazaban, C., Palya, V., & Gardin, Y. 2015. What a normal bursa of Fabricius should look like in the current chicken lines. *Acta Vet. Hung.*
- Cervantes, H. 2011. Integridad intestinal en aves. Phibro Animal Health Corp., Watkinsville, Ga., EUA
- Chapman, C.; Gibson, M. y Rowland, G. 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr*, 50(1):1-17.



- Chávez, L.A. 2014. Evaluación de cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) como inmunomoduladores nutricionales en pollos de engorde. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 78. Tesis (Magíster en Ciencias Agrarias).
- Chávez, LA; Lopez, A; Parra, JE. 2016. Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos de Zootecnia* 65 (249): 51-58.
- Chen, A. J., Luo, W., Peng, Y. T., Niu, K. L., Liu, X. Y., Shen, G. H., ... Li, S. S. 2019. Quality and microbial flora changes of radish paocai during multiple fermentation rounds. *Food Control*, 106, 13.
- Chen, G., Sleman, S. M., & Paul, A. 2015. Novel probiotics: their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. *Animal Nutrition*.
- Choct, M. 2009. Managing gut health through nutrition. *British poultry science*, 50(1): 9-15.
- Choque, J. 2008. Evaluación del estado oxidativo y salud intestinal del pollo de carne en respuesta a la alimentación con grasas recicladas. Tesis doctoral. Universitat autònoma de Barcelona, España. Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5706/jachl1de1.pdf;jsessionid=70441>
- Clevers H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2):274-284.
- Cobb-Vantress. 2012. Guía de manejo del pollo de engorde. Recuperado de <http://www.pronavicola.com/contenido/manuales/Cobb.pdf>
- Cobb-Vantress. 2018. Cobb 500 Suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición de pollos de engorde. Recuperado de <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/c8850fbe02/6998d7c0-12d1-11e9-9c88-c51e407c53ab.pdf>
- Cortés, A.C., Avila. E.G, Casaubon, T. & Carrillo, S. 2000. El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. *Rev. Veterinaria. de México* 31 :4
- Cuevas, A., Gonzales, E., Huguenin, M. Domingues, S. 2000. El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. *Veterinaria México* 31(4): 301.
- Cunningham, A.A. 2005. A walk on the wild side – emerging wildlife diseases, *British Medical Journal*, 331, 7527, 1214–5.
- Dalloul, R. A., Lillehoj, H. S., Shellem, T. A., & Doerr, J. A. 2003. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. *Poultry science*, 82(1), 62-66.
- Das, S., Ward, L., Burke, C. 2010. Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 305: 32-41
- Das, S; Ward, L; Burke, C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 419-429.

- De Gussem, M. 2007. Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. In Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition, 253-261).
- De Gussem, M. 2010. Macroscopic scoring system for bacterial enteritis in broiler chickens and turkeys. WVPA Meeting 01/04/2010. Merelbeke, Belgium
- De Jong, I. C., van Riel, J., Bracke, M. B., & van den Brand, H. 2017. A'meta-analysis' of effects of post-hatch food and water deprivation on development, performance and welfare of chickens. *PloS one*, 12(12), e0189350.
- De Souza, L. F., Araújo, D. N., Stefani, L. M., Giometti, I. C., Cruz-Polycarpo, V. C., Polycarpo, G., & Burbarelli, M. F. 2018. Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. *Austral journal of veterinary sciences*, 50(1), 35-41.
- Denli M, Okan F, Celik K. 2003. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2003; 2(2): 89-91. doi: 10.3923/pjn.2003.89.91
- Diarra, M. S. & Malouin, F. 2014. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in microbiology*, 5, 282.
- Diaz, EA; Ángel Isaza, J; Ángel D. 2017. Probióticos en la avicultura: una revisión. *Rev Med Vet*. (35): 175-189.
- Diaz, JM., Casanova, NA., Fernandez, ME. 2019. Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection?. *Microorganisms*, 7(10):1-15. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6843312/pdf/microorganisms-07-00374.pdf>
- Dibner J. J., Richards J. D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science* 84:634–643. doi: 10.1093/ps/84.4.634.
- Ding J., Dai R., Yang L., He C., Xu K., Liu S., Zhao W., Xiao L., Luo L., Zhang Y., Meng, H. 2017. Inheritance and Establishment of Gut Microbiota in Chickens. *Frontiers in Microbiology*, 8(1967):1-11. doi: 10.3389/fmicb.2017.01967.
- Domínguez, I. 2015. Influencia de la Integridad Intestinal sobre el rendimiento y la rentabilidad aviares. *AviNews*, 107- 113 p.
- Donaldson, E. E., Stanley, D., Hughes, R. J., & Moore, R. J. 2017. The time-course of broiler intestinal microbiota development after administration of cecal contents to incubating eggs. *PeerJ*, 5:
- Eckert, J. V.; Myer, R. O.; Warren, L. K.; Brendemuhl, J. H., 2010. Digestibility and nutrient retention of perennial peanut and bermudagrass hays for mature horses. *J. Anim. Sci.*, 88 (6), 2055-61
- Economou V, Gousia P. 2015. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* 8:49.

Edens, F. 2003. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. Rev. Bras. Ciênc. Avíc., 5:75-97

El-Tarabily KA., Sivasithamparam K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biology and Biochemistry. United Arab Emirates. (38):1505– 1520

Espinoza Cabello, S. J. E. 2017. Comparación del rendimiento productivo de pollos de engorde suplementados con tylosina fosfato versus enramicina como promotores de crecimiento.

Ezziyyani, M., Hamdache, P. C., Requena, M., Rubio, L., & Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología, (26):69-78. Recuperado de <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471>

Fabri T.H.F. 2000. Necrotic enteritis, Clostridial enteritis or dysbacteriosis? In Proceedings of the Elanco Symposium. Cork, Ireland.

Fallah, R.; Saghafi, M.; Rezaei, H. and Parvar, R. 2013. Effect of Bioplus 2B ® and protoxin probiotics supplementation on growth performance, small intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens. Brit J Poult Sci 2: 11-15

FAO. 2016. Probiotics in animal nutrition: Production, impact and regulation by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome.

Ferket P. 2000. Practical nutritional perspective on gut health and development. En: Proceedings 27th annual Carolina poultry nutrition conference and soybean meal symposium. Carolina Del Norte.

Ferreira, F.A.B. and Kussakawa K.C.K 1999. Probióticos Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, 8, 40-43

Forgetta, V., Rempel, H., Malouin, F., Vaillancourt Jr, R., Topp, E., Dewar, K., & Diarra, M. S. 2012. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. Poultry science, 91(2), 512-525.

Franco, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral, Universidad de Granada.

Franz, C.M.; Huch, M.; Abriouel, H.; Holzapfel, W. and Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int J Food Microbiol 151: 125-140.

Freitas, M.; Tavan, E.; Cayuela, C. y cols. 2003. Host-pathogens crosstalk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. Biol Cell, 95, 503-506

Fuller, R., 2001. The chicken gut microflora and probiotic supplements. J. Poult. Sci., 38, 189-196.

- Furtula, V., Farrell, E. G., Diarrassouba, F., Rempel, H., Pritchard, J., & Diarra, M. S. 2010. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. *Poultry science*, 89(1), 180-188.
- Gabriel I, Mallet S, Leconte M, Fort G, Naciri M. 2006. Effects of whole wheat feeding on the development of coccidial infection in broiler chickens until market-age. *Animal Feed Science and Technology*, 129:279-303
- Gaggia, F., Mattarelli, P. and Biavati, B. (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141: S15-S28.
- Gamboa, G. 2014. Adición de un cultivo microbiano casero en la dieta alimenticia de pollos parrilleros. Tesis. Universidad Tecnica de Ambato. <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/872>
- García, M. 2016. Obtención de actinomicetos marinos con acción probiótica en ostiones y cama rones. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Cuba, 150 pp.
- García, Y., Boucourt, R., Acosta, A., Albelo, N., Núñez, O. 2007. Efecto de una mezcla probiótica de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* en algunos indicadores de salud y fisiológicos de pollos de ceba en el trópico. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41(1): 71-74.
- Garrity, G. M, Bell, J. A., Lilburn, T. G. 2004. Taxonomic outline of the Prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition
- Gaskins, H. R., Collier, C. T., & Anderson, D. B. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology*, 13(1), 29-42.
- Georgieva, N. V., Gabrashanska, M., Koinarski, V., & Yaneva, Z. 2011. Zinc supplementation against *Eimeria acervulina*-induced oxidative damage in broiler chickens. *Veterinary medicine international*, 1-8. Disponible en: <http://downloads.hindawi.com/journals/vmi/2011/647124.pdf>
- Geyra, A; Uni, Z; Sklan D. 2001. Enterocytes dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Poultry Science*.80:776-782.
- Giambrone, J.J. 1996. Inmunosupresión Causas y Prevención. *Avicultura Profesional*.PDF. Editorial Antártica S.A. 14 (5):42 –45.
- Gil de los santos, J. R., Storch, O. B., and Gil turnes, C. 2005. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *Br. Poultry Science* 46, 494–497. doi: 10.1080/00071660500181461
- Gong, J., Si, W., Forster, R. J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., ... & Han, Y. 2007. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS microbiology ecology*, 59(1), 147-157.

- González Puetate, I. R. 2016. Evaluación de probióticos sobre los índices productivos y la morfometría de las vellosidades intestinales en pollos de engorde (tesis).
- González, I; Ayuso, A; Anderson, A. & Genilloud, O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS microbiology ecology*, 54(3):401-415.
- Gorbach, S. 2002. Probiotics in the Third Millennium. *Digest Liver Dis* 34: S2-7.
- Gore, A.B. & Qureshi, M.A. 1997. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. *Poultry Science*, vol. 76, 1997, 984-991
- Gorozabel, B. E. L., Solórzano, M. V. T., Nevárez, G. J. C., & Flor, F. G. I. 2020. Actividad probiótica de (*Lactobacillus* spp.), y su incidencia en el desarrollo de los parámetros zootécnicos, alométricos y de la microbiota gastrointestinal en pollos broilers. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 4(2): 96-108
- Goulart, T. 2014. Adición de probióticos en la dieta de los pollos en la etapa inicial. Tesis. Universidad de Oeste de Santa Catarina <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014b/AGRARIAS/Adicao%20de%20probióticos.pdf>
- Gunal, M., Yayli, G., Kaya, O., Karahan, N., & Sulak, O. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science*, 5(2), 149-155.
- Gutiérrez, L. A., Bedoya, O., Arenas, J. E. (2015). Assessment of productive parameters in broilers and supplemented by probiotic microorganisms. *Revista Temas Agrarios* 20(2):81-85.
- Haben, F. 2019. Probiotics and its potential role in poultry production- A review. *Veterinary Medicine Open Journal*, 4(2): 69-76. DOI: <https://www.doi.org/10.17140/VMOJ-4-138>
- Haghighi, H.R., Gong, J., Gyles, C.L., Hayes, M.A., Zhou, H., Sanei, B., Chambers, J.R. & Sharif, Sh. 2006. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 975-980
- He, T., Long, S., Mahfuz, S., Wu, D., Wang, X., Wei, X., & Piao, X. 2019. Effects of probiotics as antibiotics substitutes on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, and barrier function of broilers. *Animals*, 9(11), 985.
- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, D., Hargis, B. M., & Tellez, G. 2020. The use of probiotics in poultry production for the control of bacterial infections and aflatoxins. *Prebiotics and Probiotics-Potential Benefits in Nutrition and Health*.
- Hill, C; Guarner, F; Reid, G; Gibson, GR; Merenstein, D. J; Pot, B; Morelli, L; Canani, R. B; Flint, HJ; Salminen, S. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic (en línea). *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology* 11(8):506-514.

- Hmani, H., Daoud, L., Jlidi, M., Jalleli, K., Ben Ali, M., Hadj Brahim, A., ... & Ben Ali, M. 2017. A *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry: selection based on in vitro functional properties and enzymatic potentialities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(8), 1157-1166.
- Hoerr, F.J. 2009. La Integridad intestinal y su importancia económica en la Industria Avícola. Disponible en: [http://www.porcicultura.com/uploads/temp/Articulo\\_La\\_Integridad\\_intestinal\\_y\\_su\\_importancia\\_economica\\_en\\_la\\_Industria\\_Avicola%284%29.pdf](http://www.porcicultura.com/uploads/temp/Articulo_La_Integridad_intestinal_y_su_importancia_economica_en_la_Industria_Avicola%284%29.pdf) )
- Hosseini, Z.; Nasiri, H.; Kermanshahi, H. 2013. Effect of probiotic supplementation on broiler performance at starter phase. *Intl. J. Agri. Crop. Sci.* 5(11):1221-1223.
- Huang, M. K., Choi, Y. J., Houde, R., Lee, J. W., Lee, B., & Zhao, X. 2004. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*, 83(5), 788-795.
- Huyghebaert, G; Ducatelle, R; Immerseel, FV. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J* 187: 182-188.
- Ignatova, M., Sredkova, V., & Marasheva, V. 2009. Effect of dietary inclusion of probiotic on chickens performance and some blood indices. *Biotechnology in animal husbandry*, 25(5-6-2), 1079-1085.
- Ileana, M. 2007. *Nutrición Animal*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. Pag:105.
- Jamroz, D., A. Wiliczekiewicz, T. Wertelecki, J. Orda, and J. Skoru-pinska. 2005. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *Br. Poult. Sci.* 46:485–493.
- Jaramillo, A. 2012. Evaluación de la mezcla de un ácido orgánico y un prebiótico en los parámetros productivos y alométricos del pollo de engorde con alimentación controlada. *Revista colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 52-66. Recuperado de <http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/view/126/125>
- Jeurissen, S. H., Lewis, F., van der Klis, J. D., Mroz, Z., Rebel, J. M., & Ter Huurne, A. A. 2002. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(1), 1-14.
- Jha, R., Das, R., Oak, S., & Mishra, P. 2020. Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: a systematic review. *Animals*, 10(10), 1863.
- Johnson KV, Foster KR. 2018. Why does the microbiome affect behaviour? *Nat Rev Microbiol*, 16(10), 647-655. doi: 10.1038/s41579-018-0014-3
- Johnson, J. & Reid W. 1970. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, 28(1), 30-36
- Jones, P. J., Niemi, J., Christensen, J. P., Tranter, R. B., & Bennett, R. M. 2018. A review of the financial impact of production diseases in poultry production systems. *Animal Production Science*, 59(9), 1585-1597.

- Jouybari, M. G., Pour, V. R., Nagharchi, M. M. Z., Taghizadeh, M. R., & Dehpanah, N. 2009. The effect of novel probiotic on blood parameters and performance in broiler chickens. *Journal of Cell and Animal Biology*, 3(8), 141-144.
- Jurado Gámez, H., & Zambrano Mora, E. J. 2020. Efecto de *Lactobacillus casei* microencapsulado sobre la salud intestinal y parámetros bioquímicos y productivos en pollo de engorde. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 23(2).
- Jwher, D. M., Abd, S. K., & Mohammad, A. G. 2013. The study of using effective microorganisms (EM) on health and performance of broiler chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 27(2), 73-78.
- Kabir S. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *Int J Mol Science* 10: 3531-3546.
- Kabir, S. L., Rahman, M. M., Rahman, M. B., Rahman, M. M., & Ahmed, S. U. 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 3(5), 361-364.
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol.* 78:80-88
- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S. Michael, C. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science* 44(11):39-144.
- Karimi Torshizi, M. A., Moghaddam, A. R., Rahimi, S. H., & Mojgani, N. 2010. Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *British poultry science*, 51(2), 178-184.
- Kazemi, S. A., Ahmadi, H., & Karimi Torshizi, M. A. 2019. Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 103(5), 1399-1407.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. 2000. *Practical streptomyces genetics* (Vol. 291, p. 397). Norwich: John Innes Foundation.
- Kim, J. Y., Young, J. A., Gunther IV, N. W., Lee, J. L. 2015. Inhibition of *Salmonella* by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Derived from US Kimchi and Broiler Chicken. *Journal of Food Safety* 35(1): 1-12.
- Knobler, S. L., Lemon, S. M., Najafi, M., & Burroughs, T. 2003. A Public Health Action Plan to Combat Antimicrobial Resistance. In *The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment: Workshop Summary*. National Academies Press (US).
- Kocher A, Canolly A, Zawadzki J, Gallet D. 2004. The challenge of finding alternatives to antibiotic growth promoters. *Int. Soc Anim Hyg Saint Malo* 227:229.
- Koga, Y. 2012. *Revista Actualidad Avipecuaria* 40 (7).

- Kogut, MH., Yin, X., Yuan, J., Bloom, L. 2017. Gut health in poultry. CAB Reviews, 12(031), 1-7. Doi: 10.1079/PAVSNNR201712031
- Kollarcikova, M., Kubasova, T., Karasova, D., Crhanova, M., Cejkova, D., Sisak, F. & Rychlik, I. 2019. Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota. Poultry science, 98(6), 2347-2353.
- König, H; Fröhlich, J. 2009. Lactic acid bacteria. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), Biology of microorganisms on Grapes, in must and in Wine. Springer, pp. 3–29.
- Krasnikov, G. A., Medved', Ye. A., Matsenko, Ye. V., Gur'eva, V. B. and Shutchenko, P. A. (2006) Bursa of Fabricius as an indicator organ in histological study of the state of immunity in chickens. Actual problems of veterinary pathology and animal morphology: materials of the international scientific-production conference, Voronezh, 141–147.
- Kyung-woo L, Hyun, SL, Seung J, Guangxing L, Sung-Hyen L, Erik P, Lillehoj P, Gregory R. 2010. Effect of Bacillus-based direct-fed microbials on Eimeria maxima infection in broiler chickens. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 33(6):105-110. DOI:10.1016 / j.cimid.2010.06.001
- Landy, N., and Kavyani, A. (2013). Effects of using a multi-strain probiotic on performance, immune responses and cecal microflora composition in broiler chickens reared under cyclic heat stress condition. Iran. J. Appl. Anim. Sci. 175, 344–351.
- Lanoot, B. 2005. Improved taxonomy of the genus Streptomyces. Tesis doctoral. Universidad de Ghent, Ghent, Bélgica.
- Latha, S; Vinothini, G; Calvin, DJ; Dhanasekaran, D. 2016. In vitro probiotic profile-based selection of indigenous actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. JD9 for enhanced broiler production. Journal of bioscience and bioengineering 121(1), 124-131.
- Lee, S. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Lokhande, A., Kim, E. K., et al. (2014). Effects of dietary supplementation with Bacillus subtilis LS 1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig. Anim. Feed Sci. Tech. 188, 102–110. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.12.001
- Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. y García-Quintana, H. 2004. Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. Revista médica de Chile 132 (2): 151-159.
- Lekshmi M, Ammini P, Kumar S, Varela M. 2017. The food production environment and the development of antimicrobial resistance in human pathogens of animal origin. Microorganisms 5(1):11.
- Lescheid DW. 2014. Probiotics as regulators of inflammation: a review. FFHD 4(7):299-311.
- Lewicki J. 2006. Tylosin. A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. Tylosin Residue Review FAO 2006.



Li C-l, Wang J, Zhang H-j, Wu S-g, Hui Q-r, Yang C-b, Fang R-j and Qi G-h. 2019. Intestinal Morphologic and Microbiota Responses to Dietary Bacillus spp. in a Broiler Chicken Model. *Front. Physiol.* 9:1968. doi: 10.3389/fphys.2018.01968

Li, L. L., Hou, Z. P., Li, T. J., Wu, G. Y., Huang, R. L., Tang, Z. R., ... & Yin, Y. L. 2008. Effects of dietary probiotic supplementation on ileal digestibility of nutrients and growth performance in 1-to 42-day-old broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1), 35-42.

Lillehoj, H. S., Lillehoj, E. P. 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian diseases*, 408-425. doi:10.2307/1592556

Lin, J. 2014. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Front Microbiol* 5: 33. doi: 10.3389/fmicb.2014.00033

Lokapirnasari, W. P., Dewi, A. R., Fathinah, A., Hidanah, S., Harijani, N., Supranianondo, K., ... & Andriani, A. D. 2018. Effect of Probiotic Containing Enterobacter Spp., Bacillus Spp., Cellulomonas Spp., Actinomyces Spp., Supplementation on The Lying Performance And Egg Cholesterol of Quail. In 8 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 187 012030 (pp. 1-6). IOP Publishing.

López A, Sánchez I, Cortes A, Órnelas M, Ávila E. 2009. Uso de dos promotores naturales como alternativas a antibióticos promotores en el comportamiento productivo del pollo de engorda. *Revista de Investigaciones Veterinarias en el Perú* 24(1):32-37. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v24n1/a04v24n1>

Lutful, SM. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *Int J Mol Sci.* 10 (8):3531–3546.

Macagnan, D; Romeiro, R; Pomella, A; Souza, J. 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control. Brasil.* (47): 309 – 314.

Mancabelli, L., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G., Viappiani, A., Ossiprandi, MC., Sinderen, DV., Ventura, M. 2016. Insights Into the Biodiversity of the Gut Microbiota of Broiler Chickens. *Environ Microbiol*,18(12):4727-4738.

Marlli, A. 2013. Uso de probióticos en la nutrición de monogástricos como alternativa para mejorar un sistema de producción. Tesis. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. [http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1075/1/524\\_24223.pdf](http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1075/1/524_24223.pdf)

Marshall, B. M., & Levy, S. B. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 718-733.

Martínez, P. (2013). Comparación de dos sistemas de producción y de manejo sanitario de las aves criollas de traspatio en los municipios de Ignacio de la Llave y Teocelo, Veracruz.

Martínez, Y., Altamirano, E., Ortega, V., Paz, P., & Valdivié, M. 2021. Effect of Age on the Immune and Visceral Organ Weights and Cecal Traits in Modern Broilers. *Animals*, 11(3), 845.

Martínez, Y; Medina, R; García, M; Gutiérrez, M; Cupull, R; Díaz D, M; Casanova, M; Álvarez, I; Prendes, EJ; Soto, MA. 2019. Utilización de *Streptomyces sp.* R18 como agente probiótico en pollos de la raza Leghorn. *The Biologist*, 17(1):107-116.

Matsuzaki T, Chin J. 2000. Modulating immune responses with probiotic. *Immunol Cell Biol.* 78(1):67-73. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00887.x> 18.

McDougald, LR. 2003. Coccidiosis. In: *Diseases of Poultry*. 12th ed. Chapter 28, Ames (IA): Iowa State University Press., 1076–1085

Medina M, M. C. 2019. Identificación de potenciales probióticos bacterianos aislados de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo con actividad antimicrobiana frente a *Yersinia ruckeri*.

Medina, RP; García, CM; Wright, CG; Mazón, JM. 2018. Nueva plataforma para el descubrimiento de metabolitos secundarios y la aplicación acuícola de cepas de actinomicetos aisladas de diversos ambientes. *revista nales de la Academia de Ciencias de Cuba* 8(1):1-7.

Medina; González; Matute y Barahona. 2015. Morfología intestinal en pollos de engorde con o sin suministro de biomasa de levaduras de la producción de etanol combustible. (*Zootecnia tropical*) vol. 33 (Nº 2) pp 112 Recuperado de: <http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistasci/ZootecniaTropical/ztindice.htm#Volumen33NºI-C3%BAmero2Abril-JunioAºI-C3%B1o2015>

Meimandipour, A., Shuhaimi, M., Soleimani, A. F., Azhar, K., Hair-Bejo, M., Kabeir, B. M., ... & Yazid, A. M. 2010. Selected microbial groups and short-chain fatty acids profile in a simulated chicken cecum supplemented with two strains of *Lactobacillus*. *Poultry Science*, 89(3), 470-476.

Menconi, A., Sokale, A. O., Mendoza, S. M., Whelan, R., & Doranalli, K. 2020. Effect of *Bacillus subtilis* DSM 32315 under Different Necrotic Enteritis Models in Broiler Chickens: A Meta-Analysis of Five Independent Research Trials. *Avian Diseases*, 64(3), 379-385.

Metges, C. C. 2000. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *The Journal of nutrition*, 130(7), 1857S-1864S.

Mitchell, M. & Moretó, M. 2006. Absorptive function of the small intestine: adaptations meeting demand. *Avian Gut Funct Health Dis*, 43-63

Mokhtari, R., Yazdani, A. R., Rezaei, M., & Ghorbani, B. 2010. The effects of different growth promoters on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(20), 2633-2639.

Molero, C; Rincón, I. y Perozo, F. 2001. Factores de confort. Galpones controlados. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Venezuela. Informe de Postgrado. 70p

Molnár, A. K., Podmaniczky, B., Kürti, P., Tenk, I., Glávits, R., Virág, G. Y., & Szabó, Z. S. 2011. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *British poultry science*, 52(6), 658-665.

Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., & Fegeros, K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry science*, 86(2), 309-317.

Muñoz Medina, J. E. 2010. Evaluación de dos aditivos formados uno por anticuerpos específicos del huevo (Big Bird®) y otro, por microorganismos vivos (Probión®), incorporados solos y combinados en la dieta de pollos broilers, sobre variables productivas y económicas.

Murry AC, Hinton A, Buhr RJ. 2006. Effect of Botanical Probiotic Containing *Lactobacilli* on Growth Performance and Populations of Bacteria in the Ceca, Cloaca, and Carcass Rinse of Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science* 5(4),344-350.

Naseem, S., Rahman, S. U., Shafee, M., Sheikh, A. A., & Khan, A. 2012. Immunomodulatory and growth-promoting effect of a probiotic supplemented in the feed of broiler chicks vaccinated against infectious bursal disease. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 14, 109-113.

Nayebpor, M., Farhomand, P., & Hashemi, A. 2007. Effects of different levels of direct fed microbial (Primalac) on growth performance and humoral immune response in broiler chickens. *J. Anim. Vet. Adv*, 6(11), 1308-1313.

Neveling, D.P., Dicks, L.M. 2021. Probiotics: an Antibiotic Replacement Strategy for Healthy Broilers and Productive Rearing. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 13, 1–11 <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09640-z>

Nitsan Z., Ben-Avraham G., Zoref Z., Nir I. 1991. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *Brit. Poult. Sci.*, 32, 515–523

Núñez Torres, O. P., Arévalo Castro, R. P., E Kelly, G., & R Guerrero, J. 2017. Efecto de la Enterogermina (Esporas de *Bacillus clausii*) en el Comportamiento Productivo de Pollos de Engorde. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 861-868.

Oakley, BB; Lillehoj HS; Kogut MH; Kim WK; Maurer JJ, Pedroso, A. & Cox, NA. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 360(2): 100–112. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608>

Oelschlaeger, T. A. 2010. Mechanisms of probiotic actions—a review. *International journal of medical microbiology* 300(1): 57-62.

Olarve, JP; Mangabat, CG; Luis, E. 2007. The effect of different levels of an acidifier in the diet on the performance of broilers. *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 44(1):14-19.

Olnood CG, Beski SS, Choct M, & Iji PA. 2015. Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. *Animal Nutrition* 1(3): 184-191.

Ortiz, A. 2006. Salud intestinal, ajuste de dietas. *Actualidad Avipecuaria*, 2(3). Recuperado de [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/wpsa1176982877a.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1176982877a.pdf)

- Ortiz, A. 2013. Efecto de Ecobiol probiótico en el rendimiento de pollos de engorde. Conferencia: 19 de Simposio Europeo sobre los pollos de Nutrición, Alemania. [http://www.researchgate.net/publication/259751576\\_Effect\\_of\\_probiotic\\_Ecobiol\\_on\\_broiler\\_performance](http://www.researchgate.net/publication/259751576_Effect_of_probiotic_Ecobiol_on_broiler_performance)
- Ortiz, MA.1997. Índices de Productividad en Pollo de Engorda. Tecnología avícola en Latinoamérica, 118, 3-4
- Osorio P, C., Icochea D, E., Reyna S, P., Guzmán G, J., Cazorla M, F., Carcelén C, F. 2010. Comparison of the productive performance in broilers supplemented with probiotic or antibiotic. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP) 21(2): 219-222.
- Pan, D., y Yu, Z. 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. Gut microbes, 5(1):108-119. doi: <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>
- Panda A. K., Reddy M. R., Rao S. R., Raju M. V. L. N., Praharaj N. K. 2000. Growth, carcass characteristics, immunocompetence and response to *Escherichia coli* of broilers fed diets with various levels of probiotic. *Arch Geflügelkd*, 64,152–156.
- Park, J. H., & Kim, I. H. 2014. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. Poultry Science, 93(8), 2054-2059.
- Parra R. 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Rev Bio Agro 8: 93-105.
- Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J. I., Monfort, J. M., & Garriga, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTI-C2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. Applied and environmental microbiology, 65(11), 4981-4986.
- Patterson, J. A.; Burkholder, K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry Science 82:627-631.
- Pedroso, A. A., Menten, J. F. M., Racanicci, A. M. C., Longo, F. A., Sorbara, J. O. B., & Gaiotto, J. B. 2003. Performance and organ morphology of broilers fed microbial or antimicrobial additives and raised in batteries or floor pens. Brazilian Journal of Poultry Science, 5, 111-117.
- Pelícia, K., Mendes, A. A., Saldanha, E. S. P. B., Pizzolante, C. C., Takahashi, S. E., Garcia, R. G., ... & Komiyama, C. M. 2004. Probiotic and prebiotic utilization in diets for free-range broiler chickens. Brazilian Journal of Poultry Science, 6(2), 99-104.
- Perić L, Žikić D, Lukić M. 2009. Application of alternative growth promoters in broiler production. Institute for Animal Husbandry. Belgrade-Zemun. Biotechnology in Animal Husbandry 25 (5-6): 387-397
- Perozo, F., Nava, J. & Rivera, S. (2004). Evaluation of two vaccination programs against Newcastle disease in Ross line broiler chickens reared under field conditions in Zulia state, Venezuela. 2. Immune response and protection against an experimental challenge. Revista científica FCV/LUZ, 14, 387-394

- Potten, C. S. 1998. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1370), 821-830.
- Potturi P.V., Patterson J.A., Applegate T.J. 2005. Effects of delayed placement on intestinal characteristics in turkey poults. *Poultry Science*, 84:816-824.
- Pourakbari, M., Seidavi, A., Asadpour, L., & Martínez, A. 2016. Probiotic level effects on growth performance, carcass traits, blood parameters, cecal microbiota, and immune response of broilers. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 1011-1021.
- Prashith, TR; Vinayaka, KS; Soumya, KV; Ashwini, SK; Kiran, R. 2010. Antibacterial and antifungal activity of methanolic extract of *Abrus pulchellus* Wall and *Abrus precatorius* Linn: A comparative study. *Int J Pharmacol Toxicol*. 2: 26-29
- Prócopio, RE; da Silva, IR; Martins, MK; de Azevedo, JL; de Araújo, JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. Journal Infections Diseases*, 16: 466-471.
- Pulido, M; Barcelo, S; Perera, C. 2001. Relaciones entre algunos de los indicadores morfométricos de los órganos linfoides y la inmunocompetencia en pollos. *Rev. Cubana de Ciencia Avícola* 25(1): 45-50
- Puvadolpirod, S.; Thaxton, J. (2000). Model of physiological Stress in Chicks. *Poultry Science* 79:363-369.
- Quigley, E.M.M. 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 61: 213-218.
- Quinteiro Filho, W.M., Ribeiro, A., Ferraz de Paula, V., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Sa, L.R., Ferreira, A.J. & Palermo-Neto, J. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science*, 89. DOI: 1905–1914. 10.3382/ps.2010-00812
- Quishpe, G. 2006. Factores que afectan el consumo de alimento en pollos de carne y postura. Memoria título Ingeniero Agrónomo. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. 38 p.
- Rahimi, S., Katharionu, S., Grimes, J. L., & Siletzky, R. M. 2011. Effect of direct-fed microbials on performance and *Clostridium perfringens* colonization of turkey poults. *Poultry Science*, 90(11), 2656- 2662
- Rahman, AU; Khan, S; Khan, D; Hussain, M; Ahmad, S; Sohali, S; Ahmed, M; Haq, IU. Shah, Z. 2009. Use of probiotic in broiler feed at starter phase Sarhad. *J. Agric.*, 25, 469-473
- Ramos, CH. 2019. Identificación y caracterización de actinomicetos aislados del tracto digestivo de gallinas criollas. Tesis para optar por el título de ingeniero zootecnista. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina.

- Ribatti, D., Crivellato, E. and Vacca, A. 2006. The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clinical and Experimental Immunology*, 145(1), 1–4. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03131.x
- Reynolds D.L. 2003. Multicausal enteric diseases. *Diseases of poultry*, 11th ed. YM Saif, ed. Blackwell, Ames, IA:1169-1170.
- Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science*, 82(4), 632-639.
- Rinttila, T; Apajalahti, J. 2013. Intestinal microbiota and metabolites– implications for broiler chicken health and performance. *Journal of Applied Poultry Research* 22: 647–658.
- Roa, M. L., Guzmán, Y. E., & Navarro, C. A. 2018. Efecto del uso de probióticos en la morfometría intestinal de pollos de engorde. *Archivos de zootecnia*, 486-492.
- Rodríguez, W. 2007. Indicadores productivos como herramienta para medir la eficiencia del pollo de engorde. Recuperado de [http://amevea-ecuador.org/web\\_antigua/datos/Indicadores\\_Productivos\\_ING.\\_WASHINGTON\\_](http://amevea-ecuador.org/web_antigua/datos/Indicadores_Productivos_ING._WASHINGTON_).
- Rohollahzadeh, H., Nili, H., Asasi, K., Mokhayeri, S., & Najjari, A. H. A. 2018. Respiratory and GIT tract immune responses of broiler chickens following experimental infection with Newcastle disease's virus. *Comparative clinical pathology*, 27(5), 1241-1255.
- Rychlik, I. 2020. Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals*, 10(1), 103.
- Saitou N & Nei M 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sakhare, P.S., Harne, S.D., Kalorey, D.R., Warke, S.R., Bhandarkar, A.G. and Kurkure, N.V. 2007. Effect of Toxiroak polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicosis in broilers. *Vet. Arhiv*, 77: 129-146.
- Salim, H. M., Kang, H. K., Akter, N., Kim, D. W., Kim, J. H., Kim, M. J., ... & Kim, W. K. 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry science*, 92(8), 2084-2090.
- Samanya, M., & Yamauchi, K. E. 2002. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(1), 95-104.
- Samli H.E., Senkoylu N., Koc F., Kanter M., Agma A. 2007. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and microbiota. *Arch. Anim. Nutr.* 61, 42-49
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E., 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infectious Diseases* 6: 374–382.

SCAN. 2000. Report of the scientific committee on animal nutrition on the assessment under directive 87/153/EEC of the efficacy of microorganism used as feed additives. Scientific Committee of Animal Nutrition, Brussels, Belgium

Seija, V., Vignoli, R. 2008. Temas de bacteriología y virología médica: Principales grupos de antibióticos. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

Sen, S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, J. S., Kim, K. H., Lohakare, J. D., ... & Chae, B. J. 2012. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 264-268.

Senthilkumar, D., Rao, S., Satyanarayana, M. L., Kumar, P. G., & Anitha, N. 2018. Ameliorative efficacy of citrus oil in aflatoxin induced changes in lymphoid organs in broilers-A pathomorphological evaluation. *Indian Journal of Animal Research*, 52(10), 1462-1468.

Sepulveda, S; Beltrán, C; Peralta, A; Rivas, P; Rojas, N; Figueroa, C; Quera, R; Hermoso, M. 2008. Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Revista médica de Chile*, 136: 367-375. Recuperado de [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872008000300014&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872008000300014&script=sci_arttext)

Shahir, M. H., Afsarian, O., Ghasemi, S., & Tellez, G. 2014. Effects of dietary inclusion of probiotic or prebiotic on growth performance, organ weight, blood parameters and antibody titers against influenza and newcastle in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 13(2), 70.

Sharma, S., Agarwal, N., & Verma, P. 2012. Probiotics: the emissaries of health from microbial world. *J. Appl. Pharm. Sci*, 2(1), 138-143.

Shirisha, R., Raju, M. V. L. N., Reddy, S. S., & Reddy, V. R. 2017. Effect of dietary supplementation of probiotic (problend) on Immune Status, biochemical profile and E. coli counts in commercial broiler chicken. *Journal of Animal Research*, 7(4), 717-721.

Shojadoost, B., Vince, A. & Prescott, J.F. 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research*, 43, 74. doi: 10.1186/1297-9716-43-74

Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ramasamy K, Sieo CC, Ho YW (2017) Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PLoS ONE* 12(5): e0175959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175959>

Siggers, R.H; Thymann, T; Siggers, J.L; Schmidt, M; Hansen, A.K; Sangilda, P.T; 2007. Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate. *Livestock Science* 109, 14–18.

Silván, G. G. 2006. Promotores del crecimiento: acciones sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gónada. Portal Real Academia de Ciencias Veterinarias de España. <http://www.racve.es/publicaciones/promotores-del-crecimiento-acciones-sobre-el-eje-hipotalamo-hipofisis-adrenal-gonada/>.

- Singh, R; Shrivastava, HP and Shrivastav, A.K. 2011. Effect of dietary aflatoxin on the performance of Turkey poults. *Indian Journal of Poultry Science*, 46(2),185-188.
- Sjofjan, O., Adli, D. N., Harahap, R. P., Jayanegara, A., Utama, D. T., & Seruni, A. P. 2021. The effects of lactic acid bacteria and yeasts as probiotics on the growth performance, relative organ weight, blood parameters, and immune responses of broiler: A meta-analysis. *F1000Research*, 10(183), 183.
- Smits, C. 2001. Modulación a través de la dieta del confort intestinal de los pollitos. 2Department of Avian Virology. DLO Institute for Animal Science y Health, Lelystad. The Netherlands. FEDNA.
- Song J., Xiao K., Ke Y.L., Jiao L.F., Hu C.H., Diao Q.Y., Shi B., Zou X.T. 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poult. Sci.*, 93: 581–588
- Srinivas, G., Swathi, B., Raju, S., Tungani, R. 2018. Influence of dietary supplementation of organic acids, probiotics and their combinations on growth, carcass traits and serum parameters in broiler chicken. *Indian Journal of Animal Nutrition* 35(2):201-205.
- Stanley D., Hughes RJ, Moore RJ. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(10), 4301-4310. Doi: 10.1007 / s00253-014-5646-2.
- Stęczny, K., & Kokoszyński, D. 2020. Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition, and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm. *Animal biotechnology*, 1-8.
- Suguna, S. Rajendran, K. 2012. Production of probiotics from *Streptomyces* sp. associated with fresh water fish and its growth evaluation on *Xiphorou helleri*, *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 3: 601-603.
- Suhair Ai-Idreesi; Mahmoud Kweider; Mahmad Katranji. 2013. Immunization of broiler with dead sporozoites as vaccine against *Eimeria tenella* parasite. *Iternational Journal of Poultry Science* 12(5):280-288.
- Suzuki, K. Nakajima, A. 2014. New aspects of IgA synthesis in the gut. *Int Immunol*, 26, 489-494
- Svihus, B. 2011. La molleja: influencia de la estructura de la dieta y efectos sobre la disponibilidad de nutrientes. *WPS J* 67: 1-11.
- Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. A., & Ahmed, G. 2016. Probiotics-the versatile functional food ingredients. *Journal of food science and technology*, 53(2), 921-933.
- Talebi, A., Amirzadeh, B., Mokhtari, B., & Gahri, H. 2008. Effects of a multi-strain probiotic (PrimaLac) on performance and antibody responses to Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus vaccination in broiler chickens. *Avian Pathology*, 37(5), 509-512.



- Tambini A, Alba M, Perales R, Falcón N. 2010. Evaluación anatomo-histopatológica de bursa, timo y bazo de pollos de carne criados sobre cama reutilizada vs. cama nueva. *Revista Investigaciones Veterinaria Perú* 21(2),180 -186
- Tamura,K.;Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski,A.; Kumar, S. 2013.Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*30(12):2725–2729.
- Tang, Z., Naeem, M., Chao, W., Tian, W. Zhou, Y. 2014. Effect of dietary probiotics supplementation with different nutrient density on growth performance, nutrient retention and digestive enzyme activities in broilers. *JAPS: Journal Of Animal & Plant Sciences* 24(5):1309-1315.
- Teirlynck, E., De Gussem, M., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. Morphometric evaluation of "dysbacteriosis" in broilers. *Avian Pathology* 40(2), 139- 144
- Tellez, G. 2011. Probióticos/microbios alimentados directos para el control de Salmonella en aves de corral. *Food Research International* 45(2) 628-633.
- Thapa S, Hinrichsenb LK, Brenninkmeyer C, Gunnarsson S, Heerkens JLT, Verwer C, *et al.* 2015. Prevalence and magnitude of helminth infections in organic laying hens (*Gallus gallus domesticus*) across Europe. *Veterinary parasitology*, 214 (1-2):118-124. Doi: 10.1016 /j.vetpar.2015.10.009
- Timmerman H, Veldman A, Van den Elsen E, Rombouts F, Beynen A. 2006. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poult Sci.* 85(8): 1383-1388. doi: 10.1093/ps/85.8.1383
- Timmerman, H.M., Koning, C.J., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics: a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96: 219–233.
- Tiwari G, Tiwari R, Pandey S, Pandey P. 2012. Promising future of probiotics for human health: Current scenario. *Chronicles of Young Scientists.*3(1):17
- Tiwari, U. P., H. Chen, S. W. Kim, and R. Jha. 2018. Supplemental effect of xylanase and mannanase on nutrient digestibility and gut health of nursery pigs studied using both in vivo and in vitro model. *Anim. Feed Sci. Technol.* 245:77-90.
- Toghyani, M; Tohidi, M; Gheisari, A; Ghalamkari, G; Eghbalsaied, S. 2011. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serumbiochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science* 138 (1-3): 167–173
- Toldrá, F., Mora, L., & Reig, M. 2016. New insights into meat by-product utilization. *Meat science*, 120, 54-59.
- Torres, C. y Zarazaga, M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria* 16(2):109-112.

Torres, C., Carcelén, F., Ara, M., San Martín, F., Jiménez, R., Quevedo, W., Rodríguez, J. 2013. Efecto de la suplementación de una cepa probiótica sobre los parámetros productivos del cuy (*Cavia porcellus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24(4):433-440.

Trafalska, E; Grzybowska, K. 2004. Probiotics an alternative for antibiotics? *Wiad Lek*, 57: 491–498

Ullah, I., Arshad, M., Chuadhry, M. J. I., Noureen, U., Jadoon, W. A., Jadoon, M. A. 2012. Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec Zool Surv Pakistan* 21: 10-13.

Urbano, M. 2018. El tipo de promotor de crecimiento sobre el rendimiento productivo en pollos de carne bajo condiciones de trópico. Tesis para optar por el título de ingeniero zootecnista. Huacho, Perú, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión.

Utiyama, C. E. 2004. Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados (Tesis de doctorado). Universidade de São Paulo, Brasil

Vallejos, D., Carcelén, F., Jiménez, R., Perales, R., Santillán, G., Ara, M., ... & Carzola, F. 2015. Efecto de la Suplementación de Butirato de Sodio en la Dieta de Cuyes (*Cavia porcellus*) de Engorde sobre el Desarrollo de las Vellosidades Intestinales y Criptas de Lieberkühn. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 395-403.

Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O. S., Nirmala, P., Vinoth, K. P., Reena, A. 2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(6): 469-473.

Vásquez, H. 2016. Efecto de un concentrado proteico en dietas de preinicio sobre respuesta productiva, inmunocompetencia y metabolismo energético de pollos de carne. Tesis para optar por el título de ingeniero zootecnista. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, GF, Chater, KF y van Sinderen, D. (2007). Genómica de Actinobacteria: rastreando la historia evolutiva de un antiguo filo. *Revisión de microbiología y biología molecular: MMBR*, 71 (3), 495–548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>

Waldenstedt, L., Elwinger, K., Lunden, A., Thebo, P., Bedford, M. R., & Ugglá, A. 2000. Intestinal digesta viscosity decreases during coccidial infection in broilers. *British Poultry Science*, 41(4), 459-464.

Wang H., Ni X., Qing X., Zeng D., Luo M., Liu L., Li G., Pan K., Jing B. 2017. Live Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 Promotes Growth Performance and Lowers Fat Deposition by Improving Lipid Metabolism, Intestinal Development, and Gut Microflora in Broilers. *Front. Microbiol.*, 8, 1073

Wang, S., Chen, L., He, M. et al. 2018. Different rearing conditions alter gut microbiota composition and host physiology in Shaoxing ducks. *Sci Rep* 8, 7387 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25760-7>

- Weinberg, R. A. 1997. *Racing to the Beginning of the Road. The Search for the Origin of Cancer*. Bantam Press, London, UK
- Williams, R.B. 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology* 34, 159-180.
- Willis, W.L. and L. Reid, 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poult. Sci.*, 87: 606-611.
- Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K. M., Menendez, A., Bergstrom, K. S., Gill, N., ... & Finlay, B. B. 2011. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infection and immunity*, 79(4), 1536-1545.
- Wolfenden, R. E., Pumford, N. R., Morgan, M. J., Shivaramaiah, S., Wolfenden, A. D., Pixley, C. M., Green, J., Tellez, G., & Hargis, B. M. 2011. Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and *Salmonella* reduction in commercial turkey brooding houses. *Poultry Science*, 90(11): 2627-2631.
- Wondmeneh, E., Dawud I., Adey, M. 2011. Comparative evaluation of fertility and hatchability of Horro, Fayoumi, Lohmann Silver and Potchefstroom Koekoek breeds of chicken. *Asian Journal of Poultry Science*. 5 (3): 124-129
- Wu, Y.B.; Ravindran, V. 2004. Influence of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, digestive tract measurements and carcass characteristics of broiler chickens. *Anim. FeedSci. Technol.* 116, 129–139
- Xu, Z. R., C. H. Hu, M. S. Xia, X. A. Zhan, and M. Q. Wang. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* 82:1030–1036
- Yang, Y., Iji, P.A., Choct, M. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal* 65, 97–114.
- Yason, C. V.; Summers, B. A.; Schat, K. A. 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: pathology. *American Journal of Veterinary Research* 6, 927–938.
- Yegani, M; Korver, DR. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*, 87:2052–2063. doi: <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>
- Yeo, J., & Kim, K. I. 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Science*, 76(2), 381-385.
- Zaefarian, F., Abdollahi, M. R., Cowieson, A., & Ravindran, V. 2019. Avian liver: the forgotten organ. *Animals*, 9(2), 63.

Zaghari, M., Sarani, P., & Hajati, H. (2020). Comparison of two probiotic preparations on growth performance, intestinal microbiota, nutrient digestibility and cytokine gene expression in broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), 166-175. Doi: <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1754218>

Zhang, Z. F., & Kim, I. H. 2014. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry science*, 93(2), 364-370.

Zhao, X., Guo, Y., Guo, S., & Tan, J. 2013. Effects of *Clostridium perfringens* butyricum and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6477-6488.

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo 1: Crianza de pollos en baterías (Estudio I)



*Nota:* disposición de las unidades experimentales en los diferentes pisos de las baterías, contando con bebederos y comederos lineales

**Anexo 2: Resumen del comportamiento productivo de pollos Cobb suplementados con probióticos hasta los 28 días de edad (Estudio I)**

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso vivo (g)</b>	<b>Ganancia de peso acumulada (g)</b>	<b>Consumo de alimento acumulado (g)</b>	<b>Índice de conversión alimenticia (g/g)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Índice de eficiencia productivo europea</b>
<b>Día 7</b>						
T1	205.91	157.09	192.62	1.23	1.25	237.54
T2	205.47	156.19	184.96	1.18	0.00	248.72
T3	204.41	154.64	183.94	1.19	0.00	246.01
T4	207.37	157.70	182.98	1.16	0.00	255.93
T5	206.50	156.78	187.81	1.20	0.00	247.09
<i>p-value</i>	0.389	0.804	0.392	0.467	0.421	0.36
<b>Día 14</b>						
T1	535.91	487.09	636.56	1.31 <sup>a</sup>	0.00	289.33
T2	531.70	482.42	623.03	1.29 <sup>ab</sup>	0.00	294.26
T3	539.32	489.56	614.82	1.26 <sup>c</sup>	1.25	303.18
T4	548.57	498.91	623.32	1.25 <sup>c</sup>	2.50	305.69
T5	548.45	498.74	634.60	1.27 <sup>bc</sup>	0.00	307.99
<i>p-value</i>	0.0538	0.0674	0.125	0.0043	0.451	0.059
<b>Día 21</b>						
T1	1091.43 <sup>b</sup>	1042.62 <sup>b</sup>	1427.74	1.37	1.25	370.13 <sup>b</sup>
T2	1080.96 <sup>b</sup>	1031.68 <sup>b</sup>	1426.54	1.38	1.25	367.77 <sup>b</sup>
T3	1082.97 <sup>b</sup>	1033.20 <sup>b</sup>	1426.57	1.38	0.00	370.42 <sup>b</sup>
T4	1132.41 <sup>a</sup>	1082.75 <sup>a</sup>	1453.33	1.34	0.00	391.44 <sup>ab</sup>
T5	1127.46 <sup>a</sup>	1077.74 <sup>a</sup>	1432.60	1.33	0.00	404.02 <sup>a</sup>
<i>p-value</i>	0.00617	0.00627	0.527	0.053	0.634	0.0203
<b>Día 28</b>						
T1	1635.31 <sup>bc</sup>	1586.49 <sup>bc</sup>	2255.12	1.42	2.50	400.37
T2	1628.07 <sup>c</sup>	1578.79 <sup>c</sup>	2288.11	1.45	1.25	396.54
T3	1641.03 <sup>bc</sup>	1591.26 <sup>bc</sup>	2317.89	1.46	1.25	398.71
T4	1678.05 <sup>a</sup>	1628.39 <sup>a</sup>	2275.28	1.40	2.50	418.64
T5	1668.72 <sup>ab</sup>	1619.01 <sup>ab</sup>	2291.72	1.42	0.00	421.18
<i>p-value</i>	0.0172	0.0175	0.468	0.0832	0.634	0.132

### Anexo 3: Crianza de pollos en piso (Estudio II)



*Nota:* unidades experimentales durante la primera etapa con comedero de bandeja circular y tonquito como bebedero



*Nota:* unidades experimentales en la segunda etapa con comedero tolva y bebederos automáticos



**Anexo 4: Resumen del comportamiento productivo de pollos Cobb suplementados con probióticos hasta los 42 días de edad (Estudio II)**

Tratamiento	Peso vivo (g)	Ganancia de peso acumulada (g)	Consumo de alimento acumulado (g)	Índice de conversión alimenticia (g/g)	Mortalidad (%)	Índice de eficiencia productivo europea
Día 7						
T1	188.58	143.59	205.48	1.44	0.78	187.41
T2	183.21	138.37	197.89	1.43	0.78	184.02
T3	186.61	141.74	208.26	1.48	0.78	181.36
T4	186.18	141.42	194.52	1.38	0.78	192.09
T5	188.33	143.33	202.37	1.41	0	190.84
T6	190.28	145.45	199.80	1.38	0	198.97
<i>p-value</i>	0.5496	0.5331	0.0954	0.4632	0.7001	0.5741
Día 14						
T1	517.03 <sup>a</sup>	472.04 <sup>a</sup>	770.77	1.63	1.56	223.90 <sup>a</sup>
T2	497.01 <sup>b</sup>	452.17 <sup>b</sup>	789.56	1.75	0.78	202.61 <sup>b</sup>
T3	513.05 <sup>a</sup>	468.19 <sup>a</sup>	752.08	1.61	0.78	226.63 <sup>a</sup>
T4	517.45 <sup>a</sup>	472.70 <sup>a</sup>	768.39	1.63	0.78	226.46 <sup>a</sup>
T5	518.20 <sup>a</sup>	473.20 <sup>a</sup>	763.50	1.62	0	230.60 <sup>a</sup>
T6	520.93 <sup>a</sup>	476.10 <sup>a</sup>	757.14	1.59	0.78	233.43 <sup>a</sup>
<i>p-value</i>	0.0238	0.0218	0.7494	0.1129	0.8321	0.0408
Día 21						
T1	1063.21 <sup>ab</sup>	1018.22 <sup>ab</sup>	1614.23	1.59 <sup>ab</sup>	2.34	313.78 <sup>ab</sup>
T2	1024.57 <sup>b</sup>	979.72 <sup>b</sup>	1614.41	1.65 <sup>a</sup>	1.56	292.11 <sup>b</sup>
T3	1092.78 <sup>a</sup>	1047.91 <sup>a</sup>	1604.81	1.53 <sup>b</sup>	1.56	334.70 <sup>a</sup>
T4	1058.32 <sup>ab</sup>	1013.56 <sup>ab</sup>	1612.12	1.59 <sup>ab</sup>	0.78	314.62 <sup>ab</sup>
T5	1073.92 <sup>a</sup>	1028.92 <sup>a</sup>	1607.74	1.56 <sup>b</sup>	0	327.41 <sup>a</sup>
T6	1072.18 <sup>a</sup>	1027.35 <sup>a</sup>	1594.51	1.56 <sup>b</sup>	0.78	327.09 <sup>a</sup>
<i>p-value</i>	0.0247	0.0234	0.9819	0.0364	0.5082	0.0273
Día 28						
T1	1768.35	1723.36	2762.94	1.60 <sup>ab</sup>	2.34	385.14 <sup>ab</sup>
T2	1741.91	1697.07	2765.78	1.63 <sup>a</sup>	1.56	375.98 <sup>b</sup>
T3	1757.24	1712.38	2724.41	1.59 <sup>abc</sup>	3.91	380 <sup>b</sup>
T4	1795.54	1750.78	2743.31	1.57 <sup>bc</sup>	0.78	406.49 <sup>a</sup>
T5	1793.95	1748.95	2726.82	1.56 <sup>bc</sup>	0.78	407.88 <sup>a</sup>
T6	1782.95	1738.13	2696.31	1.55 <sup>c</sup>	0.78	407.50 <sup>a</sup>
<i>p-value</i>	0.0710	0.0694	0.1526	0.0094	0.1529	0.0166
Día 35						
T1	2590 <sup>b</sup>	2545.01 <sup>b</sup>	4215.05	1.66 <sup>a</sup>	3.13	432.87 <sup>b</sup>
T2	2605.29 <sup>ab</sup>	2560.45 <sup>ab</sup>	4255.03	1.66 <sup>a</sup>	1.56	440.94 <sup>b</sup>
T3	2617.64 <sup>ab</sup>	2572.78 <sup>ab</sup>	4185.72	1.63 <sup>ab</sup>	3.91	442.16 <sup>b</sup>
T4	2662.52 <sup>a</sup>	2617.76 <sup>a</sup>	4201.28	1.61 <sup>bc</sup>	0.78	470.41 <sup>a</sup>
T5	2663.05 <sup>a</sup>	2618.05 <sup>a</sup>	4151.23	1.58 <sup>c</sup>	0.78	476.32 <sup>a</sup>
T6	2635.66 <sup>ab</sup>	2590.84 <sup>ab</sup>	4140.09	1.60 <sup>bc</sup>	1.56	464.36 <sup>a</sup>
<i>p-value</i>	0.0392	0.0379	0.2976	0.0002	0.1695	0.0002
Día 42						
T1	3392.66	3347.66	5749.12	1.72 <sup>a</sup>	3.13	455.43 <sup>c</sup>
T2	3395.14	3350.29	5748.05	1.71 <sup>a</sup>	1.56	463.86 <sup>bc</sup>
T3	3445.06	3400.20	5663.01	1.67 <sup>b</sup>	4.69	469.47 <sup>abc</sup>
T4	3452.82	3408.07	5687.65	1.67 <sup>b</sup>	0.78	489.18 <sup>a</sup>
T5	3435.14	3390.19	5648.94	1.67 <sup>b</sup>	1.56	483.31 <sup>ab</sup>
T6	3435.49	3390.66	5640.65	1.66 <sup>b</sup>	1.56	484.38 <sup>ab</sup>
<i>p-value</i>	0.3613	0.3559	0.6539	0.0049	0.1741	0.0062

**Anexo 5: Registro de mortalidad de aves hasta los 42 días de edad (Estudio II)**

Tratamientos	Aves muertas		Edad (días)	Peso (g)	Causas de muertes
T1	3	1	8	125	Descarte por cojera de ambas patas
		1	21	467	Luxación del tendón calcáneo
		1	33	2551	Congestión pulmonar
T2	2	1	8	89	Descarte por enanismo
		1	20	806	Muerte súbita
T3	6	1	4	51	Uratosis
		1	17	196	Descarte por patas “abiertas”
		1	22	613	Descarte por enanismo
		1	23	1226	Muerte súbita
		1	28	1356	Muerte súbita
		1	38	2514	Muerte súbita
T4	1	1	6	36	Descarte por enanismo
T5	2	1	22	652	Descarte por cojera
		1	40	2607	Muerte súbita
T6	2	1	8	196	Muerte súbita
		1	33	2190	Congestión pulmonar