

Determinación *in vivo* del efecto probiótico de *Lactobacillus casei* microencapsulado mediante la técnica de spray drying, sobre morfología intestinal, respuesta inmunológica, parámetros bioquímicos y productivos, en pollo de engorde Ross 308 AP.

Edward Johnny Zambrano Mora

**Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Agrícolas
Maestría en Ciencias Agrarias
Énfasis en Producción Animal
San Juan de Pasto
2019**

Determinación *in vivo* del efecto probiótico de *Lactobacillus casei* microencapsulado mediante la técnica de spray drying, sobre morfología intestinal, respuesta inmunológica, parámetros bioquímicos y productivos, en pollo de engorde Ross 308 AP.

Edward Johnny Zambrano Mora

Asesor

Henry Jurado Gámez

Zoot. Esp. M.Sc. Ph.D

**Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Agrícolas
Maestría en Ciencias Agrarias
Énfasis en Producción Animal
San Juan de Pasto**

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º de acuerdo 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo
de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación

Efrén Guillermo Insuasty Santacruz

Zoot. Esp. M.sc.

Jurado Delegado

Eduardo Alejandro Vicuña Salazar MVZ, Esp. M.sc.

Jurado

Verónica Jarrín Jarrín

Ing. Agroindustrial M.sc.

Jurado

Henry Jurado Gámez

Zoot. Esp. M.Sc., Ph.D.

Asesor

San Juan de Pasto, julio de 2019

Agradecimiento

A Dios ante todo, que permite los recursos, el tiempo, las personas y el anhelo en el corazón para lograr nuevos objetivos.

A mi asesor, el doctor Henry Jurado Gámez por su generoso apoyo.

A los jurados de este trabajo, por su atención y colaboración.

A los colegas y docentes de la facultad de ciencias pecuarias.

Al grupo de investigación FISE-PROBIOTEC.

A la Universidad de Nariño.

Dedicatoria

A Dios que es grande y poderoso.

A mi hijo Abel Antonio Zambrano E, para que cuando crezca pueda ver en su padre un ejemplo de superación.

Resumen

El crecimiento poblacional y la necesidad de producir grandes cantidades de alimentos a bajo costo, ejercen presión constante en los productores de carne de pollo, que deben producir de una forma más rápida y rentable.

Kalmar et al (2013) afirman que la acción conjunta entre genética, sanidad, manejo y nutrición ha permitido alcanzar grandes avances en la producción avícola en las últimas décadas.

La industria avícola es una de las industrias más eficientes y avanzadas, debido a la introducción de una mayor tecnificación, implementando una gran cantidad de normas de bioseguridad, aplicando programas de sanitarios, haciendo selección genética y realizando la búsqueda, desarrollo y utilización de nuevos aditivos. López *et al*, (2009).

Todo lo anterior hace que en la industria avícola se hayan implementado como aditivos en el concentrado los llamados APC, antibióticos promotores de crecimiento. Adicional a esto, las aves confinadas a grandes densidades por metro cuadrado, sus alteraciones inmunes y el ambiente difícil del galpón, provocan una mayor incidencia de enfermedades, que requieren el uso cada vez más frecuente de antibióticos a dosis terapéuticas. El uso indiscriminado de antibióticos pone en riesgo la salud humana, por lo que se deben buscar nuevas alternativas que promuevan una producción más limpia. Castro y Rodríguez (2005).

La utilización de nuevos aditivos nutricionales como los probióticos, prebióticos, oligosacáridos, ácidos orgánicos, optimizan el establecimiento de una microbiota benéfica en los animales lo que conlleva a una disminución paulatina de enteropatógenos, mejorando la producción animal y disminuyendo el riesgo para la salud humana. Fooks y Gibson (2002); Calzadilla *et al*. (2006).

El presente trabajo investigó los efectos *in vivo* de *Lactobacillus casei* microencapsulado, como alternativa al uso de antibióticos en la producción de pollos de engorde.

Para esta evaluación se realizó la crianza de pollos de engorde en un ciclo de 35 días, durante los cuales se establecieron 5 tratamientos con tres repeticiones cada uno. El primero es el grupo testigo, que se alimentó con concentrado comercial sin antibióticos ni anticoccidiales, al grupo del primer tratamiento se le suministró concentrado comercial (con los aditivos usados por la industria), el segundo tratamiento se hizo con concentrado comercial sin antibióticos ni anticoccidiales más probiótico comercial, en el tercer tratamiento se les suministró concentrado comercial (sin antibióticos ni anticoccidiales) más *Lactobacillus casei* microencapsulado y el último grupo se trató con concentrado comercial (sin antibióticos ni anticoccidiales) más *Lactobacillus casei* sin microencapsular. Lo anterior con el fin de comparar el efecto del suministro de *Lactobacillus casei* y la microencapsulación sobre los parámetros productivos, morfología intestinal, parámetros bioquímicos y la respuesta inmunológica.

Una vez terminados los tratamientos se procedió a tomar las muestras y aplicar las metodologías.

En esta investigación, se usaron metodologías ampliamente conocidas. Para el manejo y evaluación del microorganismo, se usaron las trabajadas y descritas por Jurado et al (2011). Para medir el efecto en intestino se realizaron cortes de duodeno, yeyuno e íleon, se colorearon y observaron por el patólogo. Para establecer la producción de mucina se cuantificó microscópicamente células caliciformes con ayuda de tinciones especiales. Para medir la colonización del *Lactobacillus casei* en intestino se usó microscopía electrónica y recuentos microbianos. Metodologías enzimáticas y colorimétricas se usarán para medir parámetros bioquímicos. Metodologías de cuantificación de anticuerpos, específicamente la técnica de Elisa y HI, para evaluar la respuesta inmune y metodologías para la evaluación del rendimiento zootécnico como conversión y ganancia de peso ampliamente aplicadas y conocidas.

Los resultados de viabilidad del microencapsulado mostraron que la viabilidad y eficiencia del microencapsulado están dentro de los rangos aceptables para una microencapsulación con valores de 75,9 y 89,4% respectivamente.

De igual manera, las características físicas del microencapsulado fueron de 13,9%, 0,353, 2:24 min y 96% para las variables humedad relativa, actividad de agua, humectabilidad y solubilidad; resultados que se consideran muy favorables para este ensayo.

La evaluación bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* demostró que al cepa microencapsulada tiene de buena a excelente viabilidad con valores de crecimiento de 3×10^{11} UFC/mL a un pH de 3 y crecimientos superiores de 3×10^8 en diferentes concentraciones de sales biliares y bilis.

El tamaño y forma del microencapsulado mostro estar dentro de los valores adecuados para una correcta encapsulación de la cepa, que permita su conservación.

En cuanto a los parámetros productivos, el tratamiento T1 (alimento comercial con antibióticos y anticoccidiales) fue sacado del análisis para mejorar la interpretación. De ello, se encontró que el empleo de la cepa microencapsulada muestra muy buenos resultados.

Se concluye que el suministro de *L. casei* microencapsulado ofrece varias ventajas y es una alternativa para reemplazar a los antibióticos promotores de crecimiento (APC).

Abstract

Population growth and the need to produce large quantities of food at low cost exert constant pressure on poultry producers, who must produce more quickly and profitably.

Kalmar et al (2013) state that the joint action between genetics, health, management and nutrition has allowed to achieve great advances in poultry production in recent decades.

The poultry industry is one of the most efficient and advanced industries, due to the introduction of a greater technology, implementing a large number of biosecurity standards, applying sanitary programs, making genetic selection and conducting the search, development and use of new additives. . López et al, (2009).

All of the above means that the so-called APC, antibiotic growth promoters, have been implemented as additives in the concentrate in the poultry industry. In addition to this, birds confined to high densities per square meter, their immune alterations and the difficult environment of the house, cause a higher incidence of diseases, which require the increasingly frequent use of antibiotics at therapeutic doses. The indiscriminate use of antibiotics puts human health at risk, so new alternatives that promote cleaner production must be sought. Castro and Rodríguez (2005).

The use of new nutritional additives such as probiotics, prebiotics, oligosaccharides, organic acids, optimize the establishment of a beneficial microbiota in animals which leads to a gradual decrease of enteropathogens, improving animal production and decreasing the risk to human health. Fooks and Gibson (2002); Calzadilla et al. (2006).

The present work investigated the in vivo effects of microencapsulated *Lactobacillus casei*, as an alternative to the use of antibiotics in the production of broiler chickens.

For this evaluation, broiler chickens were bred in a 35-day cycle, during which 5 treatments were established with three repetitions each. The first is the control group, which was fed with

commercial concentrate without antibiotics or anticoccidials, the group of the first treatment was supplied with commercial concentrate (with the additives used by the industry), the second treatment was made with commercial concentrate without antibiotics or anticoccidials more commercial probiotic, in the third treatment they were given commercial concentrate (without antibiotics or anticoccidials) plus *Lactobacillus casei* microencapsulated and the last group was treated with commercial concentrate (without antibiotics or anticoccidials) plus *Lactobacillus casei* without microencapsulation. This was done in order to compare the effect of the supply of *Lactobacillus casei* and microencapsulation on the productive parameters, intestinal morphology, biochemical parameters and the immunological response.

Once the treatments were finished, the samples were taken and the methodologies applied.

In this research, widely known methodologies were used. For the management and evaluation of the microorganism, those worked and described by Jurado et al (2011) were used. To measure the effect on the intestine, cuts of duodenum, jejunum and ileum were made, stained and observed by the pathologist. To establish the production of mucin, goblet cells were quantified microscopically with the help of special stains. To measure the colonization of *Lactobacillus casei* in the intestine, electron microscopy and microbial counts were used. Enzymatic and colorimetric methodologies will be used to measure biochemical parameters. Antibody quantification methodologies, specifically the Elisa and HI technique, to evaluate the immune response and methodologies for the evaluation of zootechnical performance, such as widely applied and known conversion and weight gain.

The viability results of the microencapsulation showed that the viability and efficiency of the microencapsulation are within the acceptable ranges for a microencapsulation with values of 75.9 and 89.4% respectively.

Likewise, the physical characteristics of the microencapsulation were 13.9%, 0.353, 2:24 min and 96% for the variables relative humidity, water activity, wettability and solubility; results that are considered very favorable for this trial.

The evaluation under in vitro gastrointestinal conditions showed that the microencapsulated strain has good to excellent viability with growth values of 3×10^{11} CFU/mL at a pH of 3 and higher growths of 3×10^8 at different concentrations of bile salts and bile.

The size and shape of the microencapsulation showed to be within the adequate values for a correct encapsulation of the strain, which allows its conservation.

Regarding the productive parameters, the treatment T1 (commercial food with antibiotics and anticoccidials) was taken out of the analysis to improve the interpre

Contenido

Resumen.....	12
Abstract.....	15
2. Descripción de la propuesta.....	18
2.1 Planteamiento del problema.....	18
3. Introducción.....	21
4. Marco teórico.....	22
4.1 Antecedentes y definiciones.....	22
4.2 Antibióticos en avicultura.....	24
4.3 Probióticos.....	26
4.3.1 Características y beneficios de los probióticos.....	27
4.4 Género lactobacilos.....	29
4.5 <i>Lactobacillus casei</i>	31
4.5 Papel del probiótico en la microbiota intestinal.....	34
4.6 Efectos benéficos en las producciones avícolas.....	36
4.7 Rendimientos productivos en pollo de engorde con el uso de probióticos.....	37
4.8 Efecto probiótico en la morfología intestinal.....	40
4.9 Efectos inmunológicos en aves por la administración de probióticos.....	41
4.10 Exclusión competitiva.....	41
4.11 Microencapsulación.....	44
4.11.1 Métodos de microencapsulación.....	45
4.11.2 Metodología de la emulsión.....	45
4.11.3 Método de la extrusión.....	45
4.11.4 Método de spary-drying o desecación por atomización.....	45
4.11.5 Método de spary cooling o spray chilling.....	46
4.11.6 Método de liofilización.....	46
4.11.7 Spray coating o pulverización.....	46
4.11.8 Adhesión a almidón.....	46
4.11.9 Método de coacervados.....	46
4.12 Recubrimiento de las microcápsulas con otros polímeros.....	47
4.13 Uso de exopolisacaridos de origen bacteriano.....	48
4.14. Línea de las aves utilizada en la investigación.....	49
5.1 Objetivo general.....	51
5.2 Objetivos específicos.....	51
6. METODOLOGÍA.....	52
6.1 Localización.....	52
6.2 Periodo experimental.....	53
6.3 Materiales.....	53
6.4 Trabajo experimental.....	54
6.4.1 Preparación de la cepa probiótica para aplicar en aspersion y para microencapsular.....	54
6.4.2 Microencapsulación por la Técnica Spray Drying (Secado por Aspersion).....	56
6.5 Evaluación del microencapsulado de <i>Lactobacillus casei</i>	57
6.5.1 Estudio de la viabilidad y eficiencia del microencapsulado.....	57
6.5.1.1 Viabilidad.....	57
6.5.1.2 Eficiencia.....	58
6.5.2 Determinación de las características físicas del microencapsulado.....	58

6.6 Caracterización estructural.....	60
6.6.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas.....	60
6.7 Inclusión de los probióticos en la ración.....	61
6.7.1 Inclusión y viabilidad en la ración de <i>Lactobacillus casei</i> sin microencapsular.....	61
6.7.2 Viabilidad de <i>L. casei</i> en el concentrado inoculado.....	62
6.8 Ensayos de desafío <i>in vivo</i>	63
6.8.1 Ensayo preliminar.....	63
6.8.1.1 Toma de muestra.....	63
6.9 Plan de alimentación de las aves.....	64
6.9.1 Composición de los alimentos formulados.....	65
6.10 Inclusión del probiótico microencapsulado en la ración.....	65
6.11 Inclusión del probiótico comercial.....	66
6.12 Evaluación de los parámetros productivos de los pollos sometidos al estudio.....	66
6.12.1 Ganancia de peso.....	66
6.12.2 Consumo de alimento.....	67
6.12.3 Conversión alimenticia.....	67
6.13 Morfología gastrointestinal.....	67
6.13.1 Evaluación microscópica de tejidos.....	67
6.13.2 Procesamiento y evaluación microscópica.....	68
6.13.2.1 Tinciones especiales.....	69
6.13.2.2 Actividad y características de las vellosidades intestinales.....	70
6.13.3 Microscopia electrónica de barrido.....	70
6.14 Respuesta bioquímica, inmunológica y microscopia electrónica.....	71
6.14.1 Determinación de parámetros bioquímicos.....	71
6.14.2 Identificación de la respuesta inmune asociada a marcadores y/o inmunoglobulinas.....	71
6.14.3 Respuesta post vacunal a Gumboro, New castle y Bronquitis.....	72
6.15 Análisis del efecto de exclusión competitiva.....	73
6.16 Análisis estadístico.....	74
6.16.1 Tamaño de la muestra.....	74
6.16.2 Variables del estudio.....	74
6.16.2.1 Variables cuantitativas.....	74
6.16.2.2. Variables cualitativas.....	74
6.16.3. Diseño del experimento.....	75
6.16.4. Paquetes estadísticos.....	75
6.16.5. Hipótesis.....	76
7. Resultados Y Discusión.....	77
7.1 Ensayo preliminar.....	77
7.2 Resultados del ensayo final.....	79
7.2.1 Viabilidad del <i>L casei</i> a diferentes temperaturas.....	80
7.3 Microencapsulación de <i>L casei</i> por la técnica de Spray Drying (secado por aspersión).....	80
7.3.1 Viabilidad.....	80
7.4 Viabilidad a pH 3 y diferentes concentraciones de bilis y sales biliares.....	85
7.5 Viabilidad de <i>L casei</i> en los alimentos concentrados.....	88
7.5.1 Evaluación de la viabilidad del <i>L casei</i> sin microencapsular por la técnica de aspersión.....	88
7.5.2 Evaluación de la Inclusión del probiótico comercial.....	89
7.6 Evaluación <i>in vivo</i>	89
7.6.1 Parámetros productivos.....	90

7.6.2 Bioquímica sanguínea.....	94
7.6.3 Parámetros microbiológicos.....	95
7.6.4 Anticuerpos post vacunales.....	96
7.6.5 Resultados histopatológicos.....	98
7.6.6 Inmunohistoquímica.....	102
7.6.7 Recuento de células caliciformes.....	104
Conclusiones.....	107
Recomendaciones.....	109
Referencias Bibliográficas.....	110

Lista de tablas

Tabla 1. Definiciones de probióticos.....	24
Tabla 2. Evolución de la situación de los APC en Europa.....	25
Tabla 3. Algunos microorganismos probióticos y sus efectos.....	27
Tabla 4. Bacteriocinas y microorganismos productores.....	29
Tabla 5. Clasificación del género <i>Lactobacillus</i> según su perfil metabólico.....	30
Tabla 6. Clasificación del género <i>Lactobacillus</i> (heterofermentadores).....	31
Tabla 7. Algunos EPS bacterianos de importancia comercial.....	48
Tabla 8. Variables del estudio <i>in vitro</i> realizado en <i>Lactobacillus casei</i>	56
Tabla 9. Contenido nutricional de los alimentos concentrados.....	65
Tabla 10. Diseño de los tratamientos y muestreo.....	75
Tabla 11. Resultados de ensayo microbiológico preliminar en pollitos de 1 día.....	77
Tabla 12. Parámetros físicos del microencapsulado.....	81
Tabla 13. Variables microencapsulado a temperatura ambiente.....	83
Tabla 14. Crecimiento a pH 3.....	86
Tabla 15. Viabilidad de <i>L. casei</i>	88
Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos.....	90
Tabla 17. Parámetros productivos a los 35 días de edad.....	90
Tabla 18. Parámetros bioquímicos.....	94
Tabla 19. Colonias por ml pollos de 35 días.....	95
Tabla 20. Porcentaje de lesiones encontradas en intestino delgado.....	100
Tabla 21. Recuento de conteo inmunohistoquímico.....	103
Tabla 22. Recuento de células caliciformes.....	106

Lista de figuras

Figura 1. Adecuación de las instalaciones.....	52
Figura 2. Distribución interna de los tratamientos.....	52
Figura 3. Medición de la muestra en el espectrofotómetro.....	54
Figura 4. Aspersión e incubación, secado y almacenamiento del concentrado con <i>L. casei</i>	61
Figura 5. Proceso para determinar la viabilidad del <i>L. casei</i> en el alimento balanceado.....	62
Figura 6. Verificación de la cepa láctica con tinción de Gram.....	62
Figura 7. Pollitos de un día para toma de muestras.....	63
Figura 8. Molleja de pollitos.....	64
Figura 9. Preparado final.....	66
Figura 10. Pesaje de los animales.....	67
Figura 11. Recolección de muestras.....	69
Figura 12. Toma de muestras para inmunohistoquímica.....	71
Figura 13. Resultados de pruebas microbiológicas.....	77
Figura 14. Marcación inmunohistoquímica. Fuente: el autor.....	78
Figura 15. Morfología de <i>L. casei</i>	79
Figura 16. Fotografía con microscopia de barrido de <i>L. casei</i>	84
Figura 17. Bacteria microencapsulada vista al microscopio óptico.....	85
Figura 18. Crecimiento para bilis y sales biliares.....	87
Figura 19. Títulos de New Castle, Gumboro y Bronquitis.....	97
Figura 20. Corte histológico (HE) con implantación de <i>Lactobacillus casei</i>	98
Figura 21. Hiperplasia de células caliciformes.....	99
Figura 23. H y E, duodeno 40X.....	99
Figura 24. Atrofia y fusión.....	99
Figura 25. Hallazgos histológicos en los tratamientos evaluados.....	101
Figura 26. Láminas de inmunohistoquímica.....	102
Figura 27. Láminas Alcian blue para recuento de células caliciformes.....	104
Figura 28. Marcación de células calciformes.....	105

2. Descripción de la propuesta

2.1 Planteamiento del problema

Para obtener una buena respuesta zootécnica, se recurre al manejo intensivo en los animales de granja y en el caso de las aves, este manejo afecta la respuesta inmune, ocasionando mayor susceptibilidad a desbalances bacterianos entéricos, una insuficiente conversión de los alimentos y por tanto una disminución en la respuesta zootécnica.

Enfermedades como la salmonelosis, causada por diferentes especies de *Salmonella*, patógeno de transmisión alimentaria, cobran gran importancia por su capacidad de infectar a aves de consumo o de postura y es de gran cuidado para la salud pública (Humphrey, 2006). Lo mismo ocurre con otros microorganismos como: *Campylobacter jejuni* y *Clostridium perfringens*, los cuales afectan el rendimiento zootécnico, salud de las aves y la salud humana (Humphrey et al, 2007 y Van Immerseel et al, 2004).

De acuerdo con Milian (2005), todas estas dificultades han llevado a que la industria avícola implemente planes sanitarios con el uso de antibióticos en las dietas. Es así como en las dietas se incluye antibióticos, los cuales han mostrado ser efectivos en la disminución de los trastornos diarreicos y en la promoción del crecimiento animal.

Según lo observado por Cancho- grande *et al* (2000), los antibióticos se usan con dos fines; el primero es con fines terapéuticos, siendo los concentrados adicionados con medicamentos una de las vías más usadas para administrar el fármaco. El segundo fin es emplearse como promotores de crecimiento, favoreciendo el control de la flora bacteriana, lo que conlleva un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable de peso.

Dadas las anteriores ventajas, los avicultores han incrementado sustancialmente el uso de antibióticos en las dietas tanto para prevenir como para controlar brotes de enfermedades y es por

esto que trazas de antibióticos que salen en la carne o los huevos, podrían estar generando resistencia cruzada con algunos microorganismos que afectan a la salud humana y que terminan no respondiendo a los antibióticos comúnmente usados (Grande, et al., 2006).

Por otro lado en el intestino se llevan a cabo diferentes funciones y procesos. Además existen los microorganismos intestinales que cumplen un papel muy importante en la salud o enfermedad de los animales. Salvador y Cruz (2009) afirman que *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son una fuerte asociación que mantiene el balance microbial de los intestinos.

En los nuevos enfoques acerca de la nutrición, se plantea que los microorganismos benéficos compiten con los patógenos por los sitios de adhesión y por nutrientes (Spring, 2004). Los productos probióticos contienen microorganismos vivos y activos, que colonizan el tracto digestivo y por esto adquieren importancia y se convierten en una alternativa para mejorar la producción en una industria cada día más competitiva (Barrera, 2008).

Moreno (como se citó en Rodríguez H, 2012) comenta que las bacterias del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus* colonizan el intestino del pollito y predominan en las primeras semanas de vida, ya que cuando estos nacen su intestino es prácticamente estéril, así que el suministro de los probióticos en los primeros días es fundamental para establecer una colonización efectiva.

Como se ha establecido que la colonización de microorganismos probióticos puede desplazar a los microorganismos patógenos, se ha propuesto el uso de estos como una estrategia nutricional, ya que mejoran los parámetros productivos y sanitarios en algunas especies animales (Quigley, 2010).

Para los nutricionistas, productos de biotecnología como: probióticos, manano-oligosacaridos, selenio e inulina, son una gran alternativa para el productor, siendo promotores de

crecimiento naturales, muy seguros para el consumidor, benéficos para el animal y el medio ambiente. Los probióticos pueden usarse simples o combinados, actuando en el balance microbiano y mejorando la salud y la inmunidad (Spring, 2004).

Blajmana et al. (2007) afirman que los factores que se deben considerar en un buen probiótico son: la capacidad de utilizar prebióticos, la existencia de ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren los efectos probióticos adjudicados, deben ser reconocidos como *seguro* para la salud (Generally-Recognized-As-Safe – GRAS) y no presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad.

Pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto *in vivo*, de la administración de *Lactobacillus casei* microencapsulado mediante la técnica de spray drying, sobre la morfología intestinal, la respuesta inmunológica, los parámetros bioquímicos y productivos, en pollo de engorde Ross 308 AP?

3. Introducción

La industria avícola ha tenido un desarrollo determinante durante los últimos 20 años y el pollo se ha posicionado como el primer alimento de consumo de carne a nivel mundial, siendo necesario un aumento en la productividad particularmente de este segmento (Aguilera-Díaz 2014). Para conseguir estos resultados, el sector avícola ha invertido en la producción de nuevo conocimiento sobre los campos de la genética, la reproducción, la nutrición y el manejo (Mote & Tempio 2017).

A pesar de ello, los desafíos a que se enfrenta la industria avícola continúan siendo grandes como consecuencia de la dinámica de los mercados y sus nuevas condiciones de comercialización. Es así que el control de los productos sanitarios y su dosificación va teniendo cada día más importancia y mayores restricciones al uso de algunos productos farmacéuticos como los antibióticos (Elwinger et al. 2016).

Estas prohibiciones han incentivado la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo sanitario preventivo del pollo de engorde, y la mirada se ha centrado en la microbiota bacteriana benéfica presente en el tracto gastrointestinal de los animales y especialmente la propia de la especie; así ha surgido el estudio de los microorganismos probióticos para el manejo de problemas sanitarios como alternativa a los antibióticos (Wisselink et al. 2017).

Por ello, la presente investigación busca contribuir al conocimiento de la respuesta del pollo de engorde al suministrar microorganismos probióticos microencapsulados, en este caso *L. casei*, en las condiciones particulares de la zona del Nariño y de manera más específica en el municipio de Pasto.

4. Marco teórico

4.1 Antecedentes y definiciones.

Metchnikoff y Gupta (como se citaron en Gutiérrez L et al, 2013) hacen una revisión del uso de probióticos en la alimentación animal, anotando que el concepto de probiótico se conoció cuando el investigador Eli Metchnikoff sugirió que los campesinos de Bulgaria tenían una larga vida; esto se le atribuyó al consumo de productos de leche fermentada, los cuales tenían bacterias ácido lácticas; dichas bacterias tenían una actividad probiótica. También describe que eran unos organismos que generaban ciertos metabolitos, los cuales estimulaban el crecimiento de otros microorganismos.

“Los probióticos son microorganismos vivos y que al ser suministrados en las dietas logran una mejora en el balance microbiano intestinal, en la respuesta inmune y en la función intestinal” (FAO/WHO, 2002). A esta definición se debe agregar que no solo vivos ejercen su acción, ya que Lopez et al (2008) y Huang et al (2004) afirman que después de inactivados, y al ser suministrados, conservan propiedades benéficas para el huésped, con la ventaja de reducir los requerimientos para su conservación y duración, lo que permite su uso en el alimento peletizado.

Kralik et al (como se citaron en Samaniego et al, 2007) define a los probióticos como “aditivos alimentarios de origen biológico, constituidos por organismos vivos o muertos de diferentes especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Saccharomyces*”.

Sainsbury (como se citó en Arenas, 2014) define que las bacterias ácido lácticas (BAL) son las que por su efecto probiótico se utilizan en mayor cantidad. Los géneros como: *Lactobacillus sp*, *Leuconostoc sp*, *Pediococcus sp*, *Lactococcus sp* y *Streptococcus sp*. Levaduras del género *Saccharomyces* y algunas bacterias del género *Bacillus*, son las más representativas de las BAL.

Estas últimas se usan solas o combinadas en productos comerciales que prometen mejorar parámetros sanitarios y zootécnicos.

Gunther (1995) afirma que los probióticos incluyen organismos vivos o muertos de algunas especies como Enterococos, Streptococos, Bacillus, Lactobacillus y Sacharomyces, pero además también productos de estos como metabolitos, nucleótidos, oligosacáridos, ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético y otros.

La definición más reciente fue dada por La Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos que dice lo siguiente “los probióticos son microorganismos vivos, que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable al hospedador” (Hill, et al., 2014). La evolución del concepto de probiótico en el tiempo se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Definiciones de probióticos.

Año	Definición	Fuente
1954	Probióticos como antagonista de los antibióticos	(Vergin, 1954)
1955	Los efectos perjudiciales de los antibióticos se pueden prevenir con terapia con probióticos	(Kolb, 1955)
1965	Aquellas sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos	(Lilly & Stillwel, 1965)
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio de la microbiota intestinal	(Parker, 1974)
1991	Complemento alimentario microbiano vivo que ejerce una influencia beneficiosa sobre el crecimiento del animal hospedador mejorando el equilibrio de su microbiota intestinal.	(Fuller, 1991)
1992	Mono o policultivo de microorganismos vivos que, en el hombre o en el animal, poseen una influencia beneficiosa mejorando las propiedades de la microbiota endógena.	(Havenaar & Huis In't Veld, 1992)
1996	Cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado que ejerce un efecto positivo sobre la salud y la nutrición del huésped.	(Salminen, 1996)
1996	Microorganismos vivos que, tras su ingesta en determinado número, provocan beneficios para la salud independientemente de sus propiedades nutritivas	(Schaafsma, 1996)
1999	Preparaciones microbianas o componentes de células microbianas que tienen Efectos benéficos en la salud y bienestar del huésped.	(Salminen, <i>et Al</i> , 1999)
2002	Microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del <u>hospedador</u>	(FAO/WHO, 2002)

Fuente: Jimenez-Pranteda M.L (2010)

4.2 Antibióticos en avicultura

Desde hace 50 años, los antibióticos se empiezan a usar en avicultura y ya en los años 60 se empezaron a usar masivamente. En 1969 se estableció que estos concentrados adicionados con antibióticos como penicilinas, estreptomycin, tetraciclinas y otros, podrían tener efectos en la salud humana y que ante la poca evidencia científica de los riesgos que estos causaban, era necesario suspender el uso de estos concentrados adicionados con antibióticos hasta conocer sus consecuencias. Mientras tanto en otros países como EEUU, se masificaba el uso de estos APC (antibióticos promotores de crecimiento). Ya en el año 2016 la Unión Europea estableció la total

prohibición del uso de los APC en la alimentación animal y aunque los productores agropecuarios han manifestado su inconformidad ante el aumento de los costos por esta carencia, los avicultores de estos países han asumido con responsabilidad este reto (Ricardo-Cepero, 2005).

Tabla 2. Evolución de la situación de los APC en Europa (adaptado de Edqvist y Pedersen, 2000)

1945-1960s	Primeras advertencias del riesgo de desarrollo de resistencias bacterianas, y demostración de su transmisión vertical y horizontal.
1960s	Comienza el uso de antibióticos en piensos (penicilina, estreptomicina, tetraciclinas, ...)
1969	El Comité Swann recomienda imponer restricciones al uso de antimicrobianos en pienso, para permitir sólo aquellos no usados como terapéuticos en medicina humana y veterinaria
1970s	La mayoría de las recomendaciones Swann se llevan a la práctica en el Reino Unido y en la CEE.
1975	Relajación de las recomendaciones Swann: Se permite el uso como APC de espiramicina y tilosina, a pesar de tener análogos en medicina humana.
1984	Los granjeros suecos solicitan a su gobierno la prohibición de los APC a causa de las preocupaciones de los consumidores.
1986	Prohibición de los APC en Suecia fundamentada en el desarrollo de resistencias y en sus efectos “inseguros” a largo plazo.
1993	Primeros estudios que indican una relación entre uso de avoparcina y el aumento y transmisión de <i>Enterococos spp</i> resistentes a vancomicina, antibiótico del mismo grupo (glucopéptidos).
1995	Suecia y Finlandia entran en UE, con permiso para mantener su prohibición de los APC.
1996	Prohibición de la avoparcina en Dinamarca
1996	Prohibición de la virginiamicina en Dinamarca y de la avoparcina en Alemania
1997	La UE prohíbe la avoparcina
1997	La OMS concluye que “es esencial sustituir el uso de APC”
1998	La UE prohíbe la ardamicina como APC por riesgos de resistencias cruzadas, y el uso desde 1999 de otros 4 antibióticos (virginiamicina, bacitracina Zn, fosfato de tilosina, espiramicina) como “medida de precaución”.
1998	Dinamarca prohíbe todos los APC.
1999	El Comité científico permanente de la CE recomienda el abandono de los APC que puedan ser usados en medicina humana y veterinaria, o que promuevan resistencias cruzadas.
1999	Se prohíbe el uso de inhibidores (olaquinox, carbadox) por motivos de salud laboral
2000	La industria farmacéutica se opone judicialmente a la decisión de la CE, sin resultado.
2001-2004	Retirada de 6 sustancias anticoccidiósicas (amprolio, ídem + etopab ato, metilclorpidol, ídem + metilbenzocuat, arprinocida, nicarbacina)
2001-2004	Retirada de antihistomoniásicos (dimetridazol, ipronidazol, ronidazol, nifursol)

2006	Prohibición del uso de los restantes APC (avilamicina, flavofosfolipol, salinomicina, monensina.). Los 2 últimos podrán seguir siendo empleados en pollos como coccidiostatos.
------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.3 Probióticos

Los probióticos se diferencian de los antibióticos porque el concepto de ambos difiere desde su origen. Así antibiótico significa contra la vida, en cambio probiótico significa “para la vida” (Reid et al., 2003). Además los efectos son diferentes ya que la acción del antibiótico es inmediata e inmunosupresora en contraposición los probióticos tienen efecto inmunoestimulante y su acción es a largo tiempo ya que permiten su uso prolongado.

Caja et al. (2003), sostiene que para la industria de alimentos balanceados del sector pecuario, es necesario el uso de antibióticos para mejorar los resultados zootécnicos; sin embargo el uso de antibióticos implican un riesgo para los consumidores y el medio ambiente; por lo que el uso de probióticos que no tiene estas desventajas, se vuelve importante alternativa para estos procesos productivos.

Fuller (como se citó en Blajman et al, 2015) comenta que la crianza intensiva y los ambientes artificiales han hecho que las aves de engorde presenten una gran susceptibilidad a los agentes microbianos, disminuyendo su resistencia natural a enfermedades sobre todo de tipo intestinal, las cuales en ocasiones se incrementan con el uso de antibióticos que ocasionan un desbalance microbiano en este órgano.

En el estudio del rendimiento productivo de pollos de carne suplementados con un probiótico versus antibiótico realizado por Osorio *et al* (2010), se establece claramente como la conversión alimenticia es menor con el uso de antibióticos respecto del uso de probióticos. Adicionalmente las ventajas de no usar antibióticos para la salud pública.

4.3.1 Características y beneficios de los probióticos

Castro y Rovetto (2006) proponen un sin número de características benéficas del género *Lactobacillus* en la salud humana, entre las cuales están el control de infecciones por rotavirus, reducción de la diarrea ocasionada por el uso de antibióticos, control de infecciones urinarias y vaginales, intolerancia a la lactosa y regulación de los procesos alérgicos. En la tabla 2 se detalla algunos microorganismos probióticos y sus efectos.

Tabla 3. Algunos microorganismos probióticos y sus efectos (Ouweland, et al., 2002).

GENERO	ESPECIE	CEPA	EFEECTO
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Disminuye la diarrea asociada a antibióticos
	<i>casei</i>	Shirota	Acorta la diarrea asociada a rotavirus. Reduce la recurrencia de cáncer de vejiga. Efectos sobre el sistema inmune.
	<i>plantarum</i>	299v	Reducción del colesterol tipo LDL
	<i>johnsonii</i>	La1	Mejora la acción de vacunas orales. Disminuye la colonización de <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>reuteri</i>	SD211 2 GG	Acorta la diarrea asociada a Rotavirus rhamnosus. Acorta la diarrea asociada a Rotavirus. Efectos sobre el sistema inmune. Tratamiento y prevención de la alergia. Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal.
	<i>salivarum</i>	UCC11 8	Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>lactis</i>	Bb12	Tratamiento de la alergia Acorta la diarrea asociada a Rotavirus Disminuye la incidencia de la “diarrea del viajero” Mejora la acción de vacunas orales.
	<i>longum</i>	BB536	Efectos sobre el sistema inmune Efecto antitumoral en cáncer de colon e hígado
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Nisle 1917	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal

Ewing et al (como se citaron en Gutierrez L et al, 2013) relaciona las siguientes características para que un microorganismo sea considerado como probiótico:

1. Debe ser seguro para el animal, sin causar enfermedad ni toxicidad.
2. Resistir al pH gástrico y a las sales biliares.
3. Con la capacidad de colonizar el intestino adhiriéndose al epitelio intestinal logrando una exclusión competitiva eficaz.
4. Capaz de inhibir el crecimiento de patógenos, Gram positivos y Gram negativos por producción de sustancias y ácidos que inhiban su crecimiento.
5. Ser estable durante todos los procesos desde su inclusión en los suplementos hasta llegar con vida al intestino (Pardio, Krzysatof, Waliszewsk y Robledo, 1994).
6. De acuerdo con su metabolismo, deben poder almacenarse adecuadamente para tener estabilidad en el microorganismo.

Garcia (2002) realizó un estudio acerca del efecto del tratamiento térmico en un hidrolizado enzimático de crema de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en los niveles de colesterol en pollos de ceba, orientado por que cada vez es más urgente dar a los consumidores alimentos más sanos. Los autores concluyeron a diferencia del grupo control y del grupo con hidrolizado, el grupo sometido al hidrolizado con tratamiento térmico, tuvo un efecto hipocolesterolémico en los pollos tratados con este.

Los *Lactobacillus* generan efectos antibacterianos a través de sustancias provenientes de su metabolismo como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Marteau, 2001; Sanders, 2000).

La industria de alimentos le ha dado gran uso a estas moléculas ya que les permiten conservar alimentos sin la desventaja de los conservantes químicos que generan compuestos

secundarios. Las bacteriocinas producto del metabolismo de las BAL, se usan en procesos donde el crecimiento de bacterias patógenas como Estafilococos y Listerias, ocasionan respectivamente deterioro y contaminación de los alimentos (Stiles, 1996).

Tabla 4. Bacteriocinas y microorganismos productores.

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>
Pediocina PA-1	Iia	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	Iia	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	Iia	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	Iia	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	Iia	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	Iia	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	Iib	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	Iib	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> 9B4
Lactacina F	Iib	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	Iic	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Fuente: (Gonzales, Gomez, & Jimenez, 2003)

4.4 Género lactobacilos.

Este género está conformado por microorganismos de naturaleza ubicua y que están presentes en diferentes ambientes. Como su nombre lo indica son bacilos largos pero pueden presentarse en forma cocoide, en algunos cultivos. Utilizan para su metabolismo carbohidratos y producen principalmente ácido láctico.

Garrity et al. (2004) describe a este género como perteneciente al phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales, familia Lactobacillaceae y sus géneros más cercanos son *Paralactobacillus* y *Pediococcus* (tabla 3).

Tabla 5. Clasificación del género *Lactobacillus* según su perfil metabólico

Homofermentadores obligados				
<i>L.acidophilus</i>		<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>Indicus</i>		<i>L.manihotivorans</i>
<i>L.amylolyticus</i>		<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>		<i>L.mindensis</i>
<i>L.amilophilus</i>		<i>L.equi</i>		<i>L.nagelii</i>
<i>L.amylophilus</i>		<i>L.farciminis</i>		<i>L.pantheris</i>
<i>L.amylovorus</i>		<i>L.gallinarum</i>		<i>L.ruminis</i>
<i>L.animalis</i>		<i>L.gasseri</i>		<i>L.saerimneri</i>
<i>L.aviarius</i> subsp. <i>Araffinosus</i>		<i>L.helveticus</i>		<i>L.salivarius</i>
<i>L.aviarius</i> subsp. <i>Aviarius</i>		<i>L.iners</i>		<i>L.satsumensis</i>
<i>L.cateniformis</i>		<i>L.johnsonii</i>		<i>L.sharpae</i>
<i>L.concavus</i>		<i>L.kalixensis</i>		<i>L.tucceti</i>
<i>L.crispatus</i>		<i>L.kefiranofaciens</i> subsp. <i>Kefiranofaciens</i>		<i>L.ultunensis</i>
<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>		<i>L.kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>		<i>L.vermoldensis</i>
<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i>		<i>L.mali</i>		<i>L.vitulinus</i>
Heterofermentadores		Obligados		
<i>L.acidifarinae</i>	<i>L.fructivorans</i>	<i>L.lindneri</i>	<i>L.parabrevis</i>	<i>L.rossiae</i>
<i>L.antri</i>	<i>L.frumenti</i>	<i>L.malefermentans</i>	<i>L.parabuchneri</i>	<i>L.sanfranciscensis</i>
<i>L.brevis</i>	<i>L.gastricus</i>	<i>L.mucosae</i>	<i>L.paracollinoide</i>	<i>L.siliginis</i>
<i>L.buchneri</i>	<i>L.hilgardii</i>	<i>L.namurensis</i>	<i>L.parakefiri</i>	<i>L.suebicus</i>
<i>L.collinoides</i>	<i>L.ingluviei</i>	<i>L.oligofermentans</i>	<i>L.pontis</i>	<i>L.vaccinostercus</i>
<i>L.diolorans</i>	<i>L.kefiri</i>	<i>L.oris</i>	<i>L.psittaci</i>	<i>L.vaginalis</i>
<i>L.fermentum</i>	<i>L.kunkeei</i>	<i>L.panis</i>	<i>L.reuteri</i>	<i>L.zymae</i>

Homofermentadores y heterofermentadores obligados (adaptación de Felis y Dellaglio, 2007).

Tabla 6. Clasificación del género *Lactobacillus* (heterofermentadores)

Heterofermentadores	Facultativos	
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. paraplantarum</i>
<i>L. acidipiscis</i>	<i>L. hammesii</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. perolens</i>
<i>L. algidus</i>	<i>L. harbinensis</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. plantarum</i> subsp.
		<i>Argentoratensis</i>
<i>L. apodemi</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. rennini</i>
<i>L. bif fermentans</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>Carnosus</i>
<i>L. coleohominis</i>	<i>L. kitasatonis</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>Sakei</i>
<i>L. coryniformis</i> subsp.	<i>L. murinus</i>	<i>L. sobrius</i>
<i>Coryniformis</i>		
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>Torquens</i>	<i>L. nantesii</i>	<i>L. spicheri</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp.	<i>L. vini</i>
	<i>Paracasei</i>	
<i>L. fornicalis</i>	<i>L. paracasei</i> subsp.	<i>L. zaeae</i>
	<i>Tolerans</i>	
<i>L. fuchuensis</i>	<i>L. paralimentarius</i>	

Heterofermentadores facultativos (adaptación de Felis y Dellaglio, 2007)

4.5 *Lactobacillus casei*.

Lactobacillus casei es un bacilo microaerófilo, Gram positivo, catalasa negativa. Este organismo es considerado heterofermentador facultativo, ya que a partir de azúcares forma ácido láctico, 50% como producto principal y el otro 50% se compone de ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Utiliza los carbohidratos a través de la ruta glicolítica de Embden-MeyerHoff (Parra Huertas, 2010).

De acuerdo con los parámetros nutricionales de viabilidad de los probióticos en los alimentos, *Lactobacillus casei* cumple con los requisitos de viabilidad en los alimentos la cual debe ser mayor a 10E+6. (Gutierrez L, et al., 2009).

Aguirre et al. (2009) mencionan que *Lactobacillus casei* presenta una gran variabilidad fenotípica y genotípica, coloniza diversos órganos como los del tracto gastrointestinal en donde puede sobrevivir, instalarse y favorecer positivamente a este sistema.

Jiang (2016) encontró un efecto inmunoestimulante por la administración oral de *Lactobacillus casei*, contra el coronavirus causante de gastroenteritis, específicamente aumentando la respuesta humoral (Th1 y Th 2).

Este Lactobacilo se puede clasificar estudiando su relación filogenética con otros microorganismos. Gordon & Doelle (1976) encontraron que en experimentos de inmunodifusión, la lactato deshidrogenasa que muestra este Lactobacilo, cepas ATCC 393 L(+), no está inmunológicamente relacionada con los Streptococcus del grupo D, pero en cambio se confirma su relación con otras cepas del *L casei* y con la cepa *L. plantarum* ATCC 14917.

Zaninia et al. (2007) afirman que *L casei* es una cepa que presenta buenas características para sobrevivir en el tracto digestivo y se potencializa en su viabilidad y población por la presencia de Bifidobacterias.

Autores como Yuki y col., 1999; Brink y Todorov, 2006 (como se citó en Aguirre-Ezkauriatza, et al. 2009) hablan de esta especie de Lactobacilo por ser particularmente resistente a rangos amplios de pH.

Varios autores mencionado en el trabajo de Aguirre-Ezkauriatza, et al. (2009) adjudican a *Lactobacillus casei* propiedades como: mejora la capacidad de digestión, mejora la tolerancia a la leche, efecto antimicrobiano, ayuda a la disminución de los niveles de colesterol, disminución de diarrea por infecciones gastrointestinales, es coadyuvante en la digestión de la lactosa, estimulador del sistema inmune, regulador de las funciones intestinales, competidor o bacteriostático de flora patógena a nivel intestinal.

En contraposición a estos efectos sobre el sistema digestivo Salazar-Lindo et al. (2004) realizaron un estudio en niños con enfermedad diarreica por rotavirus y otros agentes, con relación al efecto del suministro de *Lactobacillus casei* cepa GG; concluyeron que la evolución

de pacientes con enfermedad diarreica después de 120 días de tratamiento fue similar entre el grupo testigo y el grupo tratado.

Charteris et al. (1998) realizaron un ensayo *in vitro* simulando el paso de los probióticos por el estómago y el intestino delgado de un humano e investigaron la supervivencia de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en el tracto digestivo superior, evidenciando que solo el *Lactobacillus fermentum* KLD, fue resistente al ácido gástrico.; sin embargo *Lactobacillus casei* cepa 212.3 y *Bifidobacterium infantis* cepa 25962, exhibieron una tolerancia al tránsito gástrico del 100 % en presencia de proteínas de la leche.

Los mismos autores concluyen que la mayoría de los lactobacilos y bifidobacterias son resistentes a sales biliares, por lo que sobreviven bien en el intestino delgado que es en donde se producen, mientras que pueden ser intrínsecamente sensibles al paso por el estómago. Además, se postula que las proteínas de la leche y la mucina pueden funcionar como agentes tamponantes e inhibidores de la actividad de la proteasa digestiva *in vivo*, protegiendo así las cepas bacterianas ingeridas durante el tránsito gastrointestinal superior.

En cuanto al uso de *L casei* en la industria, Parra (como se citó en Regino K et al, 2014), analiza que en la acidificación de lactosuero por fermentación de *Lactobacillus casei* ayuda a producir una fermentación controlada, inhibiendo patógenos, reduciendo el contenido de lactosa y formando aromas característicos. Cury K et al (2014), encontró que al inocular *Lactobacillus casei* en diferentes proporciones (5 %,10 %y 15 %) el mayor crecimiento del cultivo se experimentó en lactosueros inoculados con 15 % de *Lactobacillus casei* y desproteinizados, sin alcanzar el valor de acidificación deseada durante el tiempo de fermentación.

García C, Arrázola G y Villalba M (2013), estudiaron a *Lactobacillus casei* en su capacidad de producir ácido láctico a partir de lactosuero y en presencia de diferentes compuestos. Ellos

encontraron que este microorganismo daba mejor rendimiento para ácido láctico, en comparación con otros microorganismos y que este rendimiento está directamente relacionado con la concentración en el medio de lactosa (fuente de carbono) y de sulfato de amonio (fuente de nitrógeno); de tal forma, que aplicado al lactosuero requiere una mayor suplementación con fuentes de nitrógeno que de carbono.

4.5 Papel del probiótico en la microbiota intestinal

Jinmo Yeo & Kyu IL (1996), explican que la microbiota intestinal interactúa con su huésped y esta cambia dependiendo de la especie en la cual reside, el sitio del sistema digestivo donde prolifera, la edad, tipo de dieta y medio ambiente. Estos microorganismos desempeñan una función muy importante ya que sus metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico y vitaminas, son beneficiosos para el animal. También explican que algunos microorganismos intestinales desdoblan la urea que llega al intestino y la actividad de esta ureasa puede ser medida para calcular la cantidad de bacterias que están ejecutando este proceso y así poder usar los probióticos para mejorar este balance microbiano.

Reforzando lo anterior, una consideración importante frente a uso de probióticos es que estos son específicos de especie ya que la adhesión de la especie probiótica mejora por factores específicos de unión para colonizar el sistema digestivo. Lara C et al 2011. Citando a Frizzo et al 2006.

Jerningan et al (como se citó en Osorio C, 2010), plantea que una parte de la microbiota intestinal se encuentra directamente asociada al epitelio y otra parte suspendida en la luz intestinal.

Rondon et al 2008 y Lu et al 2003 (como se citó en Lara et al, 2011) establecen que las aves nacen con un sistema digestivo estéril y que en condiciones silvestres adquieren la microbiota intestinal de secreciones de las madres y del contacto con el ambiente. Hoy en día estos pollitos nacen en condiciones estériles y en los galpones debido a las condiciones de manejo, el intestino de estas aves termina colonizándose por microbios no tan benéficos.

Gabriel L et al (como se citó en Blajman J et al, 2015). También afirma que naturalmente el intestino de las aves se ve colonizado desde el primer día por diferentes microorganismos del entorno y llega a ser una compleja mezcla de bacterias, hongos y protozoos; con predominio bacteriano.

La colonización que realizan las diferentes bacterias probióticas cambia de acuerdo al lugar del intestino. Los microorganismos más predominantes en íleon son en orden descendente: *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. En cambio en ciegos es más importante el *Clostridium*. Lu J, et al (1997).

Corrier et al (como se citaron en Lara C et al, 2011), describe a los *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y levaduras como microorganismos que al colonizar el intestino, mejoran los rendimientos productivos y reducen patógenos intestinales.

Bacterias como *E coli* y *Salmonella spp*, son importantes por el daño que hacen al colonizar sistemas de pollos en confinamiento y por ocasionar pérdidas por trastornos intestinales; así que la intervención en la composición de la microbiota intestinal es una buena alternativa para conseguir buenos rendimientos y mejorar la salud de las aves. (Chambers, et al., 2011).

Hess, Arias y Piad et al (como se citaron en Samaniego et al, 2007), agregan que deben ser económicos, naturales y que no dejen residuos. Además estimular el sistema inmune y mejorar los índices productivos.

4.6 Efectos benéficos en las producciones avícolas

El desarrollo de la microbiota intestinal en las primeras etapas de la vida es análogo para las distintas especies animales (Smith y Crabb, 1961) siendo la flora láctica, la que inicialmente coloniza el aparato digestivo del lechón (Premi, 1974), ternero (Smith, 1967) y pollo (Ochi *et al*, 1964; Sarra *et al*, 1992).

El lumen puede colonizarse únicamente cuando la velocidad de paso de los alimentos no exceda el tiempo necesario para la multiplicación de los microorganismos. Por el contrario, la superficie epitelial es asiento de esa multiplicación, independientemente del flujo intestinal, ya que los gérmenes se adhieren a las estructuras del epitelio o bien se encuentran suspendidos en las secreciones producidas por las células epiteliales (Savage, 1979 y 1980). Así, la microbiota de un determinado segmento del tracto digestivo puede darse por la adhesión de las bacterias a la superficie intestinal la que proporciona un buen sistema para las bacterias entéricas, resistiendo las adversas condiciones de un medio en movimiento.

En el pollo, esta capacidad de los lactobacilos para establecerse y colonizar el buche, fue ampliamente estudiada por diferentes autores. Investigadores del Reino Unido que demostraron mediante microscopia electrónica la existencia de una capa de lactobacilos aviares íntimamente asociada con las células del buche (Fuller y Turvey, 1971; Fuller, 1973; Brooker y Fuller, 1975) confirmando así, la observación previamente hecha por investigadores japoneses (Morishita *et al*) en 1971. Más tarde, se observa como los lactobacilos no penetran más allá de la superficie epitelial (Fuller y Brooker, 1974, 1980), por lo que no alteran la arquitectura de la mucosa (Savage, 1984).

Bayer et al (como se citaron en Rodriguez M, 1994) evidenciaron la presencia de una abundante población bacteriana en la pared del buche, principalmente colonizando la superficie en la región más cercana al esófago y en menos cantidad en el área apical.

Según serrano *et al* (2000), cada vez es más frecuente el uso de probióticos en la avicultura, en general, la razón de esto, es el amplio abanico de ventajas que ofrece su uso. Debido a que los probióticos son de origen natural, seguros, generalmente estables, no producen efectos acumulativos y provienen del tracto intestinal de la misma especie animal para las cuales van a ser usadas. Tiene una acción benéfica incluso a través de su suministro como probiótico inactivado. (Palamidi, et Al., 2016).

4.7 Rendimientos productivos en pollo de engorde con el uso de probióticos.

Así mismo, autores como Batt et al (1996); Kalantzopoulos (1997) y Nimruzi, (1999) afirman que el uso de probióticos provoca en general, una mejor conversión del alimento, un aumento del peso vivo y del crecimiento del ave; debido a que las bacterias ácido lácticas proporcionan nutrientes digeribles, vitaminas y enzimas digestivas, ayudando a la digestión, síntesis, absorción de las vitaminas y minerales, lo cual facilita el metabolismo de los alimentos. Por otra parte Clifford (2000), sostiene que dichas bacterias benéficas permiten mantener la flora intestinal en equilibrio y por consiguiente evitar la saturación de los patógenos intestinales, ya que cualquier amenaza a la salud gastrointestinal incide negativamente en la productividad total de la producción avícola. Siendo reconocidos los resultados de su aplicación en las crías intensivas de las aves. Oliver, (1996).

Lyons (1997), menciona que los probióticos al ser usados como promotores de crecimiento en los animales, permiten obtener mayores rendimientos, disminución de patógenos intestinales,

elevada inmunidad y disminución del uso de antibióticos y sus metabolitos en los productos finales.

Reforzando esto algunos autores como Kabir *et al* 2004; Sánchez *et al*, 2007; Wang y Gu, 2010; Sinol Sen *et al*, 2011, han reportado que los probióticos mejoran los parámetros productivos de las aves

Otros autores consideran que en condiciones normales de explotación, los probióticos pueden no tener efecto alguno o mejorar las condiciones productivas, como ganancia de peso y eficiencia alimentaria. Arends L, (como se citó en Cortes A et al, 2000).

Osorio et al. (2010), estudiaron los rendimientos productivos de pollos suplementados con un probiótico comparado con un grupo alimentado con antibiótico, encontrando que no hubo diferencias significativas entre los rendimientos zootécnicos de los dos grupos, pero anotan que ante las implicaciones actuales por el usos de antibióticos, el uso de probióticos representa una buena alternativa como promotor de crecimiento.

Arenas (2014), en su trabajo de grado, evaluó parámetros zootécnicos de pollos de engorde suplementados con probióticos y encontró que en el tratamiento de pollos alimentados con probióticos las ganancias de peso superaron al grupo no tratado, lo mismo que mejoraron los parámetros de mortalidad y conversión alimentaría. Por lo que concluye que el suplemento probiótico si influye sobre los parámetros anteriormente analizados.

En otro estudio realizado por Sinol et al. (2011), se alimentaron experimentalmente pollos de engorde con *Bacillus subtilis* LS 1-2 cultivado en sustrato de residuos de jugo de cítricos, *Bacillus subtilis* en sustrato de maíz y soja y los compararon con otros grupos alimentados con antibiótico (avilamicina) y encontró que la inclusión de *Bacillus subtilis* LS 1-2 al nivel de 0.30% era una ventaja, debido a que los desechos de jugo de cítricos se pueden usar como

sustrato para el crecimiento del probiótico y que con su uso se encontraron efectos positivos en el rendimiento de crecimiento de los pollos de engorde atribuido a la retención de nutrientes y mejoría de la morfología intestinal.

Khana et al. (2011), realizó otro estudio evaluando el peso corporal y la conversión alimentaria de las aves en donde ambos parámetros resultaron favorecidos por la administración de probióticos, de igual forma se observa disminución de la mortalidad y reducción de los niveles de colesterol al compararlo con el grupo al que no se le suministró el probiótico.

Jin et al (2000), estudiaron el efecto de dos probióticos (*L. acidophilus* 126 y una mezcla de 12 lactobacilos) sobre el crecimiento de pollos parrilleros. Los autores comprobaron que la ganancia de peso era superior en los pollos tratados con probióticos respecto del grupo control. Así mismo la eficiencia de conversión alimenticia de los grupos tratados con probióticos mejoró en relación con los controles.

Blajman et al (2015), recogieron información de diferentes estudios acerca del rendimiento de pollos parrilleros a los que se les suministro probióticos (solos o combinados) y concluyeron que el aumento promedio de peso en pollos que consumieron probiótico superaba en 661 gramos a los que no lo consumieron; de igual forma la conversión alimenticia fue mejor, debido a que los pollos a los que se les suministro el probiótico necesitaron 281 g menos de alimento por cada kilogramo de peso ganado.

En cuanto al efecto en los parámetros zootécnicos se puede evidenciar en varios estudios, como el suministro de probióticos en pollo de engorde, mejoran el desempeño en ganancia de peso, consumo y conversión. (Cortes A, et al., 2000. Palamidi I, et al., 2016).

En el estudio realizado por Mantilla C y Burgos A (2012), trabajaron 3 cepas nativas con potencial probiótico, de los géneros: *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp* y *Saccharomyces sp.*, las

cuales mostraron la mayor tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal como: crecimiento a pH 3, concentración de sales biliares y de NaCl de 0.3 %, y 7 % respectivamente, Temperatura 43 °C, exclusión competitiva a patógenos y alta capacidad de crecimiento.

Estos mismos autores pudieron concluir in vitro que al adicionar estas cepas probióticas en la alimentación animal y desde el inicio de la crianza en el pollo de engorde, pueden ser usados para controlar tanto microbiota bacteriana patógena como microorganismos patógenos e incrementar el rendimiento productivo.

4.8 Efecto probiótico en la morfología intestinal.

La administración de probióticos reduce la implantación de patógenos que ocasionan diversos daños en el epitelio intestinal, como la disminución del tamaño de vellosidades por inflamaciones crónicas, alteración de procesos de digestión y absorción. Chambers and Gong, Lodemann y Plaza et al (como se citó en Chávez et al 2015).

En un estudio de investigación acerca de los efectos de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus subtilis*, usados como probióticos en aves de postura, midieron morfometría de vellosidades y criptas en grupos tratados con probióticos en diferentes concentraciones y a diferentes tiempos y observaron que los individuos tratados con el probiótico mejoraron su desarrollo y peso de órganos, lo cual se correlacionó con la morfometría de las microvellosidades y criptas intestinales, en donde las primeras mejoraron su altura y las segundas disminuyeron su profundidad.

En el estudio realizado por Sinol S et al, (2011) al comparar las medidas de criptas y vellosidades de un grupo de pollos tratados con *Bacillus subtilis*, se evidenció que en íleon y

duodeno, si había un efecto en la mayor altura de las vellosidades con relación a la profundidad de las criptas.

4.9 Efectos inmunológicos en aves por la administración de probióticos.

Forte C et al. (2016), realizaron un estudio de cambios en la inmunología, salud y enfermedad de aves de postura, y midieron el grado de inflamación representado por la cantidad de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares, en intestino de diferentes grupos de aves, obteniendo una reducción significativa de estos parámetros inflamatorios en los individuos tratados con suplemento probiótico.

Maldonado C & Perdogo G (2006), realizaron un estudio sobre la respuesta inmune en intestino de ratones y concluyeron que las principales células inmunes activadas después de la administración oral de *L. casei*, fueron las del respuesta inmune innata, con un aumento en los marcadores específicos de estas células (CD-206 y TLR-2), mientras que al medir las células T no encontraron variación.

4.10 Exclusión competitiva

Consiste en la competencia que hacen los probióticos por los sitios de adhesión a nivel del intestino, específicamente compitiendo con bacterias patógenas, disminuyendo en estas últimas, la capacidad de multiplicarse y por lo tanto de colonizar, logrando una inmunoestimulación al entrar en contacto con receptores específicos, incrementando la producción de linfocitos T y B, incrementando la producción de ácido láctico, logrando una disminución en la producción de toxinas y aumentando la absorción de nutrientes y enzimas de la luz intestinal. Fuller y Watkins et al (como se citaron en Cuevas A et al, 2000).

Se ha comprobado que la falta de microbiota nativa intestinal (MNI), adquirida del ambiente en el momento del nacimiento, ha vuelto susceptibles a las aves ante diversos patógenos. Nurmi y Rantala (como se citó en Estrada M et al 2010).

Van Eys & Den Hartog (2003), comentan que una de las características importantes de los probióticos es que deben suministrarse en una cantidad suficiente para que puedan implantarse en algún lugar del aparato digestivo modificando la microbiota.

Blankenship et al (como se citó en Samaniego L et al, 2007), define a la mezcla de exclusión competitiva MEC, como aquella compuesta por microorganismos, nutrientes y factores intestinales que se combinan para desplazar agentes patógenos. El mismo autor cita a Murry et al 2004, quien comprobó como *Lactobacillus salivarum* y *Lactobacillus plantarum*, producen ácido propionico, acético y láctico, los cuales bajan el ph intestinal y no permiten el desarrollo de patógenos como *E coli*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*.

La *Salmonella* es uno de los principales patógenos que compromete la salud humana y animal. *Salmonella gallinarum* que afecta a aves, se viene controlando en las producciones avícolas y ese nicho lo ha estado ocupando *Salmonella enteritidis*, la cual es muy patógena para los humanos. Mahe et al & Guard (como se citó en Estrada M et al, 2010).

Estrada M et al (2010), realizaron un ensayo en donde utilizaron un probiótico compuesto por: *Enterococcus spp*, *Bacterioides spp*, *Bacillus spp* y otros; para medir el grado de exclusión competitiva contra *Salmonella enterica*. Encontraron que el uso del probiótico constituye una buena alternativa para la prevención y erradicación de la *Salmonella enteritidis* en la avicultura.

Con respecto al mismo patógeno, E. Van Coillie et al. (2006), evalúa in vitro el efecto de inhibición de *Salmonella* por *Lactobacillus* aislado de gallinas ponedoras, evidenciado que el uso de este probiótico puede ayudar a controlar a este patógeno.

Yamawaki et al. (2013), realiza un estudio en el que hace inoculación in ovo con *Lactobacillus spp.* Dos días después de la eclosión inocula con altas dosis de *Salmonella enteritidis*. Realiza un muestreo en pollos de 5 días de vida, pero no encuentra disminución de la colonización en ciego de *Salmonella enteritidis*, llegando a la conclusión de que con este grado de inoculación de *S enteritidis* no hay diferencias significativas por el suministro del probiótico comparado con el grupo control.

Sin embargo en este mismo año Yamawaki (2013), Estrada M y Col. (2010), si encontraron una ventaja con respecto a la administración de probióticos y la exclusión competitiva, ya que permitía prevenir la invasión de *Salmonella enteritis* en hígado, bazo y tonsilas cecales, en las aves que recibieron el probiótico.

Años después, analizando el efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre microbiota intestinal de pollos broiler, se pudo encontrar que hay un efecto negativo provocando un decrecimiento significativo sobre poblaciones de enterobacterias, anaerobios y coliformes totales. Vargas M, 2014.

Por su parte Forte C et al. (2016), estudiaron acerca de los efectos de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus subtilis*, usados como probióticos en aves de postura, observaron como en los grupos tratados con *Lactobacillus*, los recuentos de *E coli*, *Staphylococcus* y *Clostridium* disminuyeron mientras que microorganismos benéficos como *Bifidobacterium spp* incrementaron en número. Por lo que se concluye que el suministro de probióticos reduciría el efecto dañino de algunos microorganismos.

Al comparar experimentalmente pollos de engorde suplementados con *Bacillus subtilis* LS 1-2, cultivado en sustrato de residuos de jugo de cítricos para compararlo con otros grupos alimentados con antibiótico (avilamicina) y *Bacillus subtilis* en sustrato de maíz y soja. Sinol S

et al. (2011), encontraron que el grupo suplementado con antibiótico tenía más bajos recuentos microbianos de *Clostridium* y Coliformes cecales; sin embargo es necesario considerar las implicaciones actuales del uso de estos antibióticos en la salud pública.

4.11 Microencapsulación.

La estabilidad de los microorganismos probióticos es importante debido a que si sufren alteraciones en la producción, almacenamiento o en su paso por el tracto gastrointestinal, no ejercerían el efecto deseado en el organismo. El principal objetivo de la microencapsulación aplicada a los probióticos, consiste en que al ser suministrado mejora la viabilidad del probiótico y permite que resista el paso por el estómago en el cuál la acidez destruiría al microorganismo.

El concepto de microencapsulación es planteado por Champagne & Fustier, (2007). “la tecnología empleada para el embalaje y envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones”.

Para efectuar la microencapsulación existen diferentes métodos y se pueden usar diferentes materiales. Los exopolosacaridos microbianos ofrecen una buena alternativa ya que estos naturalmente protegen a algunos microorganismos de la acción de los ácidos digestivos y además son usados ampliamente en la industria. Entre estos están gelano, xantano, pululano y jamilano (Jimenez-Pranteda M.L 2010).

La microcapsula se conforma de una membrana con unas características específicas que le permiten ser semipermeable al medio, le permite intercambio de nutrientes y metabolitos para mantener viable al microorganismo; además es flexible, delgada, resistente; protegiendo al contenido de la acidez, concentración de oxígeno, condiciones gástricas y permitiendo que el

contenido se libere lentamente como consecuencia de su ruptura, disolución o inclusive por difusión del contenido desde adentro hacia afuera. (Kailasapathy, 2002).

4.11.1 Métodos de microencapsulación

Existen muchos métodos para realizar la microencapsulación, ya que como se había mencionado, este proceso se lleva a cabo a en muchas industria como la de alimentos, la farmacéutica, la agricultura e inclusive la medicina.

Para realizar con éxito este proceso es necesario obtener cultivos en condiciones óptimas para luego centrifugar y usar en suspensión o polvo. (Jiménez-Pranteda M.L, 2010).

4.11.2 Metodología de la emulsión.

Se basa en aislar una fase acuosa en donde están los Lactobacillus, por medio de una fase oleosa que la rodea. Usando para esto aceite vegetal, de soja, de maíz y otros. Se homogeniza y se forma un emulsión entre agua y aceite. (de Vos et al, 2010).

4.11.3 Método de la extrusión.

Consiste en hacer pequeñas gotas de la suspensión bacteriana que se hacen gotear sobre una solución de endurecimiento. En esta se emplean disolventes no dañinos para las bacterias y se puede hacer en condiciones aerobias y anaerobias y se puede producir a gran escala. (Chandramouli et al 2004).

4.11.4 Método de spary-drying o desecación por atomización.

Consiste en atomizar en aire caliente, una suspensión del probiótico en la matriz del material elegido para encapsular, consiguiendo que se evapore el agua y el probiótico quede como en partículas de polvo. Tiene el inconveniente de que las altas temperaturas pueden afectar la supervivencia del bacilo. . (de Vos et al, 2010).

4.11.5 Método de spary cooling o spray chilling.

En este método se emplea aire frío para solidificar la partícula y se inyecta en un recipiente a través de una boquilla una matriz fundida. Tiene la ventaja de emplear bajas temperaturas y puede ofrecer esta ventaja en el manejo de microorganismos. (Champagne & Fusier , 2007)

4.11.6 Método de liofilización.

Utiliza la congelación del producto y luego separa el agua por sublimación, logrando así un producto seco. El inconveniente que se le ha encontrado es la posible pérdida de la actividad biológica de los microorganismos. . (de Vos el al, 2010).

4.11.7 Spray coating o pulverización.

Aquí se usa un material liofilizado de microorganismos, luego es suspendido en el aire y la matriz de encapsulación es pulverizada sobre el mismo. (Champagne & Fusier , 2007).

4.11.8 Adhesión a almidón.

El almidón que no es digerido en el paso por el intestino delgado, se usa para encapsular los probióticos y protegerlos del ambiente intestinal.(Anal & Singh, 2007).

Mattila-Sandholm, et al., 2002 realizaron un ensayo con almidón de patata, tratados enzimáticamente para generar más poros y luego sellados con amilosa. Luego se liofilizaron estas capsulas y observaron que las LAB podía sobrevivir hasta 6 meses.

4.11.9 Método de coacervados.

La coacervación a menudo se usa para cosméticos y productos farmacéuticos y es un enfoque físico-químico para la preparación de microcápsulas poliméricas. La coacervación compleja es un tipo específico de formación de complejos donde las interacciones de la electrostática son principalmente responsables de la separación de una fase rica en biopolímeros. Bajo condiciones ambientales apropiadas, se forman complejos insolubles entre los biopolímeros

que interactúan y conducen a la formación de dos fases líquidas distintas: una fase superior, que es pobre en biopolímeros y rica en solventes y una fase inferior, que se concentra en biopolímeros (Schmitt, et al., 1998). Sistemas interesantes de coacervación compleja son aquellos entre proteínas y polisacáridos iónicos de carga opuesta; por ejemplo, la pectina ha sido un polisacárido aniónico popular para la coacervación compleja con β -lactoglobulina. (Girard et al., 2003; Wang et al., 2007). Una vez formado, el coacervados se ven como estructuras dinámicas, adaptables, capaces de responder a los cambios ambientales (pH, fuerza iónica y temperatura) reorganizándose para generar una distribución de carga apropiada cuando el ambiente no es ideal: Esta propiedad de los coacervados (reordenamientos estructurales) también puede ocurrir durante el almacenamiento en donde estas modificaciones pueden darse a un ritmo relativamente lento (Moschakis et al., 2010; Weinbreck, et al., 2004).

En este método se usa un aislado de proteína de suero de leche (WPI, 3 % p / v) y soluciones de goma arábica (GA, 3 % p / v) mezcladas a una relación de peso de 2: 1. Se espera que la viabilidad de células microencapsuladas sea mayor de 86%, lo que implica protección mejorada en comparación con la libre células (<59 %). La coacervación compleja con WPI / GA tiene el potencial de suministrar probióticos en vivo a bajo pH, también se usa para alimentos o productos fermentados; también es importante tener en cuenta que los complejos se pueden disolver a pH 7.0 (entorno intestinal) liberando las células microbianas (característica deseada de la entrega del objetivo). (Bosnea, et al., 2014).

4.12 Recubrimiento de las microcápsulas con otros polímeros.

Entre estos materiales están polisacáridos diferente origen, como por ejemplo la leche y la gelatina procedentes de animales, el alginato proveniente de algas marinas, almidón de plantas, goma arábica de plantas, gelano y xantano proveniente de bacterias. Estos materiales hacen

resistente al microorganismo hasta llegar al intestino, para posteriormente liberarlos en este órgano. . (de Vos et al, 2010).

4.13 Uso de exopolisacaridos de origen bacteriano

La definición de exopolisacaridos o EPS la dio Nicolaus, et al., (2010), son “polímeros de elevado peso molecular compuestos por residuos azucarados y que son secretados por microorganismos al medio que los rodea”.

En la siguiente tabla se describen los principales EPS.

Tabla 7. Algunos EPS bacterianos de importancia comercial.

EXOPOLISACARIDO	MICROORGANISMO PRODUCTOR
Curdano	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Gelano	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Desulfatoheparina	<i>Escherichia coli K5</i>
Ácido hialuronico	<i>Streptococcus equi</i> y <i>zoepidermicus</i>
Succinoglucano	<i>Agrobacterium spp</i> <i>Rhizobium spp</i>
Lantano	<i>Xantomonas campestris</i>

Fuente: Jiménez-Pranteda M.L (2010).

En el estudio de Rodklongtan (2014), se evalúa una microcápsula de alginato-quitosano, in vitro para el suministro en pollos y se evidenció que *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 microencapsulado en mezclas de alginato y quitosano usando una emulsión, reveló una gran cantidad de bacterias atrapadas en la red semiinterpenetrante de la microcapsula y protegió efectivamente las células contra ácidos fuertes.

La eficiencia de la microencapsulación se calcula basada en la proporción del número de células vivas liberadas de la microcapsula sobre el número de células inicialmente mezcladas con el polímero.

4.14. Línea de las aves utilizada en la investigación.

El Ross 308 AP, es un pollo de engorde desarrollado por Aviagen, una multinacional norteamericana que tiene reconocimiento a nivel mundial en venta de genética aviar. Suministra abuelas y reproductoras de un día de edad a más de 100 países del mundo. En la línea de pollo de engorde cuenta con la Ross 308 AP que se caracteriza por ser un pollo robusto, de rápido crecimiento, conversión alimenticia eficiente y con buen rendimiento de carne. Estos atributos son importantes para el productor avícola en la crianza de aves ya que representen buen rendimiento y bajo costo.

La empresa Aviagen destaca los siguientes puntos como importantes para el rendimiento de esta línea.

a-Maximizar la calidad de los pollitos por medio de un óptimo manejo de las condiciones de nacimiento, almacenamiento y transporte.

b-Diseñar el sistema de crianza para garantizar el fácil acceso al agua y al alimento durante el alojamiento, así como para facilitar la transición entre los sistemas suplementarios y los bebederos y comederos a los 4-5 días.

c-Suministrar una dieta Iniciadora que sea altamente digerible y balanceada a nivel nutricional.

d-Mantener a los pollitos en su zona de confort térmico, monitoreando su comportamiento, pero estar atento a los niveles bajos de humedad relativa (HR menor al 50 %).

e-Establecer un programa de ventilación mínima desde el primer día.

f-Monitorear el llenado del buche, la ingesta de alimento y de agua y el peso a los 7 días de vida, para permitir una mejoría continua del sistema de crianza.

g-Mantener a las aves en su zona de confort térmico durante todo el período de crecimiento.

Los pollos de engorde de crecimiento rápido producen grandes cantidades de calor, especialmente en la segunda mitad del período de crecimiento. El mantener la temperatura ambiental a menos de 21°C (69.8 °F), a partir del día 21 puede mejorar las tasas de engorde.

h-Mantener estándares altos de bioseguridad y limpieza, con el fin de reducir al mínimo el nivel de enfermedades. (Folleto Aviagen 2017).

En cuanto a los requerimientos nutricionales y demás aspectos, se especifican claramente en la página web de Aviagen, en donde se encuentran los documentos con respecto a manejo, nutrición y rendimientos esperados para la línea.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar *In vivo* el efecto probiótico de *Lactobacillus casei* microencapsulado mediante la técnica de Spray Drying, sobre morfología intestinal, respuesta inmunológica, parámetros bioquímicos y productivos, en pollo de engorde Ross 308 AP.

5.2 Objetivos específicos

- Efectuar el proceso de microencapsulación de *Lactobacillus casei* mediante la técnica de Spray Drying.
- Medir el efecto de *Lactobacillus casei* sobre la morfología intestinal.
- Comparar la respuesta bioquímica e inmunológica de los pollos sometidos a los diferentes tratamientos.
- Determinar los parámetros productivos de los pollos sometidos al estudio.

6. METODOLOGÍA

6.1 Localización.

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Clínica Veterinaria Carlos Martínez Hoyos y en el laboratorio del grupo de investigación FISE-PROBIOTEC de la Universidad de Nariño, Municipio de Pasto, departamento de Nariño, Colombia, ubicado a una altura de 2527 msnm y a una temperatura promedio de 14 °C. Las instalaciones para la cría y manejo de los animales se realizaron en la clínica veterinaria mencionada (figura 1 y 2).



Figura 1. Adecuación de las instalaciones.



Figura 2. Distribución interna de los tratamientos.

6.2 Periodo experimental

La fase experimental y el ensayo de campo se realizaron en un periodo de 12 meses.

6.3 Materiales

- Elementos de construcción de bioterio (galpón) para el levante del pollo.
- Termómetro y termo higrómetro.
- Alimento concentrado comercial.
- Viruta de madera.
- Vacunas de New Castle.
- Equipos: bebederos y comederos, criadora, termo higrómetro, bombillos de 20 LUX, incubadora, agitadora magnética, pipetas, refractómetro, Secador Spray Bilon 6000s®, centrifuga.
- Elementos para toma de muestras: cassettes para inclusión de tejidos, bolsas herméticas.
- Material biológico (Pollos de engorde-linea Ross 308 AP, *Cepa de Lactobacillus casei* y probiótico comercial)
- Indumentaria de bioseguridad
- Nevera plástica
- Desinfectantes: jabón líquido desinfectante, glutaraldehído 25%, yodo, formol, amonio cuaternario.
- Vidriería
- Reactivos.
- MRS (Man, Rogosa y Sharpe), agua peptonada.

6.4 Trabajo experimental

6.4.1 Preparación de la cepa probiótica para aplicar en aspersión y para microencapsular.

6.4.1.1 Obtención de biomasa microbiana y ajuste del inóculo.

La activación de la cepa de *L casei* se realizó de acuerdo al instructivo de la casa comercial obteniéndose una cepa pura con la cual se realizó repiques semanales en las mejores condiciones de esterilidad. Se tomó un Erlenmeyer con 40 mL de caldo MRS estéril, se depositó una asada de la cepa láctica y se llevó a incubación a 35°C por 24 h. Al terminar el periodo de incubación, se tomó 4 mL del preparado y se depositó en un nuevo Erlenmeyer con otros 40 mL de caldo MRS estéril, este se incubó en las mismas condiciones del anterior preparado. Nuevamente se realizó un repique de 4 ml de está a otro Erlenmeyer que contenía 40 ml de caldo MRS y fueron incubados en las condiciones antes mencionadas.

Se preparó 90 ml de caldo MRS estéril y se adicionaron 10 ml del inóculo probiótico aplicando la regla de Cruger y Cruger (1998) y descrita en Jurado-Gómez et al. (2015). El porcentaje de inóculo se ajustó al 10% v/v para iniciar la fermentación.

Para calcular el número de UFC/mL, se tomó 1 mL del caldo MRS con inóculo y se realizó lectura directa en espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11 UV-vis a 550 nm (figura 3).



Figura 3. Medición de la muestra en el espectrofotómetro.

La fórmula usada para este procedimiento fue la siguiente:

M1= población o densidad celular que se debe ajustar

M2= densidad óptica utilizada primera fermentación

V1= volumen proveniente del inóculo total

X1= cantidad que contiene M2

V2= lo que se agrega a V1 para ajustar la población bacteriana requerida.

V3= cantidad total del inóculo

X2= cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V3 para ajustar la población el valor de M2

Se encuentra entonces X1

M1 ----- M2

M2 ----- X1

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Se encuentra entonces V2

V2= V1 - X1

Finalmente se obtiene el valor de X2

V1 -----V2

V3----- X2

$$X_2 = \left(\frac{V_3 * V_2}{V_1} \right)$$

Los parámetros de la cinética de fermentación para la obtención del inóculo se tomaron de lo encontrado por Calpa et al. (2014) y que se pueden observar en la tabla 8.

Tabla 8. Variables del estudio *in vitro* realizado en *Lactobacillus casei* en medio de cultivo PRO.

	Fase lat	0
Velocidad específica de crecimiento (μh^{-1})		2.187
Fin fase log (h)		14:24
Tiempo de duplicación (min)		19
Incremento cel. Total		8.9×10^{10}
Incremento cel. Fin fase log		3×10^{11}
% azúcares consumidos totales (g/L)		46.32
% azúcares consumidos fin fase log (g/L)		31.00
r^2		0.938

Fuente: Jurado et al. (2014).

6.4.2 Microencapsulación por la Técnica Spray Drying (Secado por Aspersión).

Una vez realizado el ajuste del inóculo se continuó con el procedimiento descrito por Rodríguez et al. (2016). Para la investigación se preparó 400 mL de *Lactobacillus casei* al 15% p/v (60 g de Maltodextrina y 60 g de Inulina en 280 mL de inóculo bacteriano previamente ajustado), los cuales fueron agitados hasta homogenizar. Se utilizó el equipo de secado por aspersión Secador Spray Bilon 6000s®, con una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida de 65 a 67°C, con ciclo completo de 2 horas y 30 minutos. El material obtenido (microencapsulado) se envasó en recipientes plásticos oscuros previamente esterilizados y se almacenó a temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

6.5 Evaluación del microencapsulado de *Lactobacillus casei*.

6.5.1 Estudio de la viabilidad y eficiencia del microencápsulado.

Para las evaluaciones de los materiales microencapsulantes (maltodextrina e inulina) se utilizó lo propuesto por Rodríguez et al. 2016 de la siguiente manera:

6.5.1.1 Viabilidad

El recuento de células vivas se realizó en 1 g de material microencapsulado, rehidratada a temperatura ambiente en 9 mL de agua de peptona tamponada al 0.1% p/v (pH 7.2 ±2) homogeneizado en vortex (Marca Boeco V1 Plus), que se dejó reposar durante 30 minutos para favorecer la liberación del microorganismo.

Luego se tomó 100 µL de dilución y se sembró en superficie sobre medio MRS con azul de anilina (0.1%), finalmente se incubó en condiciones aerobias a 37°C por 48 horas. Los recuentos se realizaron por duplicado y se expresaron como UFC/g en base seca, para cada condición experimental (Champagne, *et al.*, 2011).

El porcentaje de viabilidad para cada muestra se calculó según la fórmula (1) (Semyonov, 2010; Rodríguez- Barona, *et al.*, 2012).

$$\% \text{ Viabilidad} = \left(\frac{N}{N_o} \right) * 100 \quad (1)$$

Dónde:

N_o = número de células viables por gramo de materia seca antes del secado

N = número de células viables por gramo de material encapsulado.

La viabilidad para *L. casei* aplicado en aspersión se realizó después del mismo procedimiento de ajuste de inóculo y mezclado en el concentrado. Se evaluó con muestras tomadas después de 3, 6, 9 y 15 días de almacenar el concentrado tratado. Para esto se realizaron diluciones y siembras desde 10^6 hasta 10^{12} con la finalidad de realizar recuentos que permitan garantizar un mínimo de 10^9 UFC por gramo de alimento suministrado.

6.5.1.2 Eficiencia.

La eficiencia se determinó mediante la metodología propuesta por Gonzales et al (2015), donde se tomó 2 g de material microencapsulado y se diluyeron en 18 mL de agua destilada, que fueron centrifugados a 5000 r.p.m. (criocentrífuga HERMLE 2326K, Germany) por 15 minutos con el fin de separar las células libres de *L. casei*. Enseguida se determinó la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculó la eficiencia de la encapsulación con la siguiente fórmula (2):

$$EE (\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100 (2)$$

Dónde:

A= concentración bacteriana antes de la microencapsulación.

B = concentración de la bacteria después de microencapsular (encontrada en el sobrenadante).

6.5.2 Determinación de las características físicas del microencapsulado.

Para ello se tuvo en cuenta las variables humedad, actividad de agua, solubilidad y humectabilidad.

6.5.2.1 Humedad.

Para ello se tomaron 2 g de material microencapsulado y se llevó al determinador de Humedad KERN DBS 60-3 (Balingen – Germany) a una temperatura de 105°C con una Resolución de 0.001 g. (0.01%). El resultado se expresó en porcentaje de base seca (% bs).

6.5.2.2 Actividad de agua.

Se tomó 2 g de material microencapsulado y se determinó mediante lectura directa usando un Termo higrómetro Hygrolab Rotronic (Nürnberg-Alemania) previamente calibrado. El resultado se expresó en porcentaje de base seca (% bs).

6.5.2.3 Solubilidad.

Se disolvió 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada, ésta solución se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ en incubadora (Memmert, Germany). La suspensión obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante y se transfirió a una caja petri previamente pesada; se llevó a estufa (Memmert, Germany) a 105°C por 5 h hasta obtener peso constante y observarse una muestra seca. Los sólidos recuperados se pesaron después del secado (*mf*) y se calculó el porcentaje de solubilidad con la diferencia de pesos mediante la siguiente fórmula (3).

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100 \% (3)$$

Dónde:

$M_i = 0,25 \text{ g}$ (1g/100 mL=0,01 g/mL x 25 mL del líquido sobrenadante = 0,25 g).

6.5.2.4 Humectabilidad.

Se determinó por el método de humectación estática de Freudig et al. (1999) modificado por Ceballos et al. (2012) y Rodríguez et al. (2016) y adaptado por el autor. Para ello, se utilizó un beaker de 100 mL de 5 cm x 7 cm. Una cantidad de microencapsulado (1 g), se colocó en una lámina portaobjetos encima del beaker, posteriormente se retiró el microencapsulado de la lámina y, sin perturbación, se puso en contacto con el agua. El tiempo de humectación expresado en minutos correspondió al tiempo que se tardó la inmersión completa de un 1 g muestra de microencapsulado depositado suavemente sobre 100 mL de agua a 20°C.

6.6 Caracterización estructural.

Para lo cual se evaluó el tamaño y la morfología del microencapsulado.

6.6.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas.

La morfología y tamaño de las microcápsulas fueron determinadas mediante un Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA 650 FEG. Para ello, las muestras se colocaron sobre stabs metálicos con cinta adhesiva de carbón, se recubrieron con oro en un equipo de recubrimiento Quorum 150ES. Las imágenes fueron tomadas con las siguientes características: alto vacío; voltaje de aceleración 10kV; Detector para imágenes: Electrones secundarios (SE): everhart thornley detector ETD. El análisis fue realizado por el Centro de Microscopia y Microanálisis de la Universidad Nacional en Bogotá, Colombia.

6.7 Inclusión de los probióticos en la ración.

6.7.1 Inclusión y viabilidad en la ración de *Lactobacillus casei* sin microencapsular.

Inicialmente se realizó un ajuste del inóculo de *Lactobacillus casei* (procedimiento anteriormente descrito).

Posteriormente, el inóculo fue adicionado por aspersión sobre el alimento balanceado, que se distribuyó de manera homogénea en bandejas y se puso en incubadora a 37°C por 30 minutos para su secado. Luego, el alimento fue empacó en bolsas al vacío para minimizar su deterioro (figura 4). Se trabajó una cantidad de inóculo probiótico adicionado (relación v/p) del 20%, según lo recomendado por Ramírez (2005).

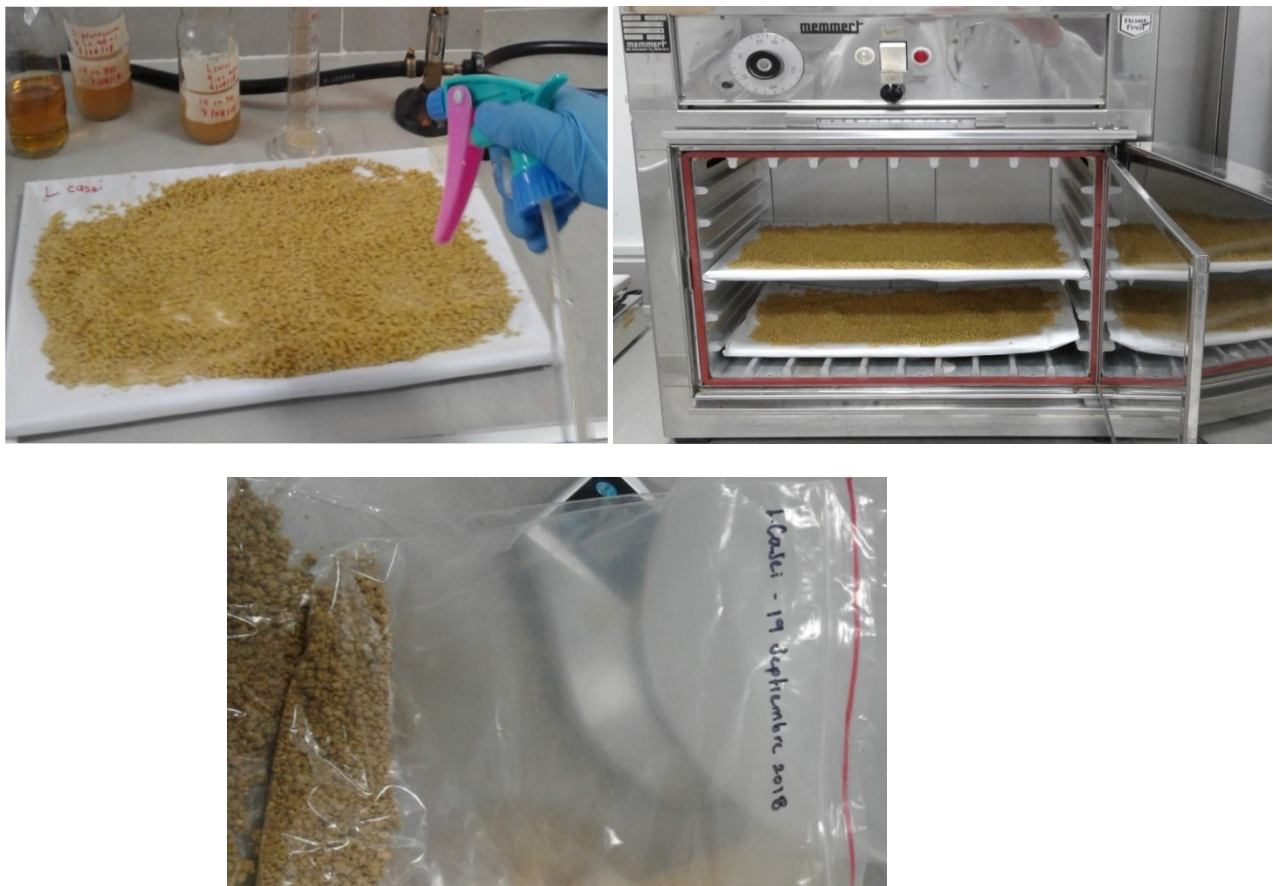


Figura 4. Aspersión del concentrado e incubación, secado y almacenamiento del concentrado con *L. casei*.

6.7.2 Viabilidad de *L. casei* en el concentrado inoculado.

El concentrado inoculado con *L. casei* se incubó a una temperatura de 37°C por 24 h, con el fin de dar mayor viabilidad de los microorganismos fijados. Transcurrido este periodo se tomó una muestra del material homogeneizado y se sembró en agar MRS con azul de anilina, con el fin de verificar el crecimiento de *L. casei*, buscando un crecimiento igual o mayor a 10^9 UFC/mL para de esta manera, ser suministrada a los pollos.



Figura 5. Proceso para determinar la viabilidad del *L. casei* en el alimento balanceado.

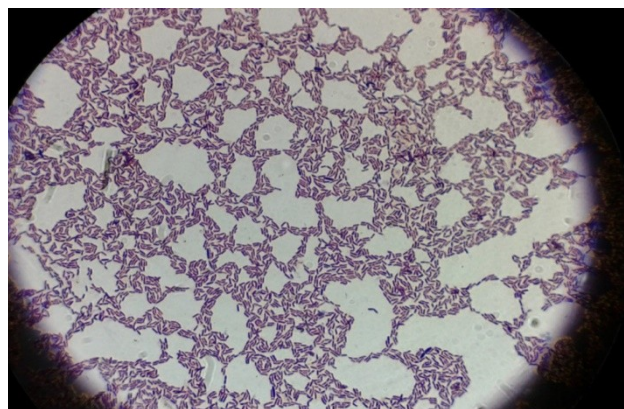


Figura 6. Verificación de la cepa láctica con tinción de Gram.

6.8 Ensayos de desafío *in vivo*

6.8.1 Ensayo preliminar

Inicialmente se realizó una prueba microbiológica en muestra de pollitos de un día. Se realizaron dos pruebas a 4 individuos seleccionados de manera aleatoria con el objetivo de determinar un primer análisis que nos sirviera como base para la prueba de exclusión competitiva midiendo dos parámetros (figura 7).

A- Presencia o ausencia de *Lactobacillus* sp.

B- Recuento de Coliformes y *E. coli*.

6.8.1.1 Toma de muestra

Una vez se realizó el sacrificio de los pollitos, se incidió piel y tejido subcutáneo para llegar a la cavidad abdominal y ubicar allí la primera porción del duodeno.



Figura 7. Pollitos de un día para toma de muestras.

También se realizó la extracción de la molleja, de esta porción se realizó un corte en condiciones de esterilidad y se tomó, con un hisopo, una muestra de la luz de este órgano. Dicho

hisopo se llevó a un tubo con 9 mL de agua peptonada y se realizaron diluciones hasta 10^{-3} . De esta dilución se sembró 100 μ L en superficie para recuento de mesófilos y se sembró 1 mL en petrifilm 3m para recuento de Coliformes y *E coli* (figura 8).

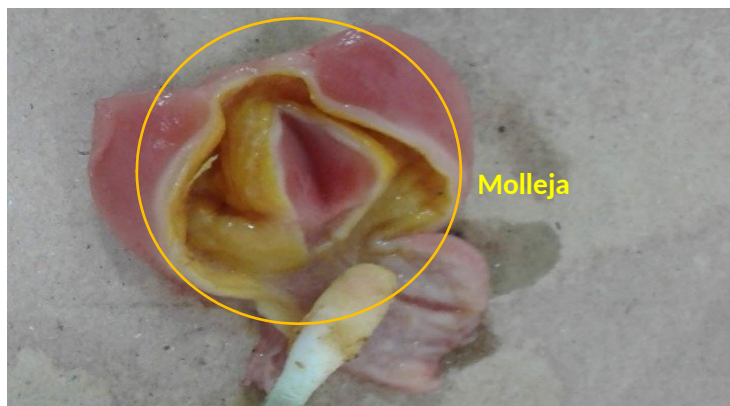


Figura 8. Molleja de pollitos.

6.9 Plan de alimentación de las aves.

La inclusión de los probióticos en la dieta de los animales se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Jurado-Gómez (2009), donde se evaluó un probiótico comercial y un probiótico elaborado a nivel de laboratorio.

El periodo de alimentación tuvo una duración de 35 días. La alimentación de las aves se realizó en dos tiempos (mañana y tarde), suministrando el mismo tipo de concentrado (pollo campesino de una marca comercial reconocida. Este concentrado se caracteriza por no tener aditivos como anticoccidiales ni promotores de crecimiento) en todas las fases de crecimiento a todos los tratamientos (excepto en el tratamiento en el que se suministró concentrado con antibiótico y anticoccidial, que se conoce como concentrado pollo engorde de una marca comercial reconocida).

En la alimentación de la mañana se suministró el probiótico en sus dos formas (microencapsulado y sin microencapsular, es decir, por aspersion), y en la tarde solo la ración de

concentrado respectivo sin microorganismos manejando *ad libitum*, para así permitir la expresión libre del consumo y de la ganancia de peso en los diferentes grupos.

6.9.1 Composición de los alimentos formulados.

El alimento suministrado fue de las líneas comerciales de pollo campesino y su contenido nutricional se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Contenido nutricional de los alimentos concentrados.

Nutriente	Sin	Con
Proteína cruda	13	12
Grasa	2,0	2,5
Humedad (Máx)	13	12
Fibra	13	8
Ceniza (Máx)	10	8

Sin: alimento concentrado sin antibióticos ni anticoccidial (línea campesina), **Con:** alimento concentrado con antibióticos y anticoccidial (línea campesina).

6.10 Inclusión del probiótico microencapsulado en la ración.

Una vez microencapsulado, el probiótico se suministró en la ración diaria de los pollos, mezclado de manera homogénea en una porción de alimento de la primera comida de la mañana en una cantidad de 2 gramos por comedero (7 pollitos), con el fin de que sea consumido en su totalidad y garantizar que no se humedezca el preparado (figura 9).



Figura 9. Preparado final.

6.11 Inclusión del probiótico comercial.

La cantidad del probiótico comercial y la forma de suministró se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial para su preparación y adición.

También se evaluó la viabilidad de este probiótico comercial siguiendo la metodología de Jurado- Gámez (2010).

Se realizaron diluciones en agua (como es la forma de suministro del probiótico) y siembras en agar MRS para determinar la concentración de UFC por mL de este producto.

6.12 Evaluación de los parámetros productivos de los pollos sometidos al estudio.

Se determinaron los parámetros consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia durante todo el periodo de evaluación.

6.12.1 Ganancia de peso

Las aves se pesaron semanalmente con el fin de determinar la ganancia de peso de los pollos. Esta actividad se realizó en las horas de la mañana a la misma hora, antes del suministro del alimento y del probiótico.

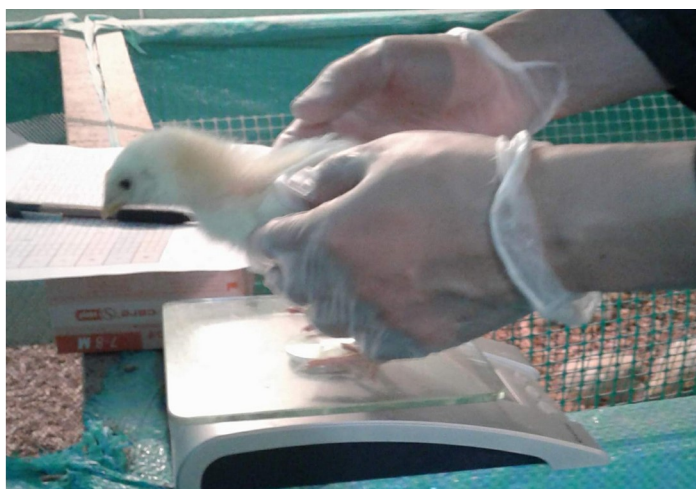


Figura 10. Pesaje de los animales.

6.12.2 Consumo de alimento.

Para esta variable se pesó el alimento suministrado en horas de la mañana, para en la tarde volver a pesar el alimento desperdiciado (lo que quedó en los comederos); de esta diferencia se obtuvo la cantidad de alimento efectivamente consumido.

6.12.3 Conversión alimenticia.

Para determinar el parámetro se utilizó la formula (4) que relaciona el consumo de alimento con la ganancia de peso.

$$CA = \frac{\text{Consumo de alimento todo el periodo}}{\text{Ganancia de peso de todo el periodo}}$$

6.13 Morfología gastrointestinal.

6.13.1 Evaluación microscópica de tejidos.

Para realizar el presente estudio, se tuvo en cuenta los principios de ética biomédica descritos por Beauchamp (2001), que establece los principios de respeto de la autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Para la manipulación de los animales incluidos en el

estudio, también se tuvo en cuenta los protocolos establecidos en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2011)” y la normatividad nacional vigente: resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud Colombiano (1993), la ley 84 de 1989 que contempla los lineamientos para el uso de animales vivos en experimentos e investigación, así como el sacrificio de animales y la crueldad para con los animales. El sacrificio de los animales se realizó mediante el método establecido por las autoridades competentes y que no genera sufrimiento en los animales.

Se realizó el muestreo de los animales, siguiendo la técnica de necropsia aviar, estandarizada por Díaz-Fierro (2015).

Una vez sacrificado el grupo de animales, se efectuó la disección y extracción del tracto gastrointestinal, específicamente del intestino delgado, se identificó la sección anatómica para localizar los órganos al momento de la evaluación microscópica. Se tomó 6 muestras por tratamiento (2 de cada repetición), 30 muestras para cada análisis, (marcadores inmunológicos, microscopia electrónica e histología) para un total de 60 muestras en los 5 tratamientos. Las muestras de intestino delgado se ubicaron en recipientes plásticos debidamente rotulados con formol buferado al 10 % para su fijación durante 24 horas.

6.13.2 Procesamiento y evaluación microscópica

Posterior a la fijación en formol por 24 horas, se realizó cortes del segmento del tracto gastrointestinal seleccionado y obtenido de las necropsias por el patólogo veterinario (6 segmentos, Intestino delgado) de cada tratamiento y se ubicaron en cassettes para inclusión de tejidos debidamente rotulados y se almacenaron en recipientes con formol buferado al 10% (figura 10).



Figura 11. Recolección de muestras

Seguidamente se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina y coloración de Hematoxilina y Eosina (H/E), en el Laboratorio de Patología de la Fundación Hospital San Pedro del Municipio de Pasto.

6.13.2.1 Tinciones especiales.

Finalizado el reconocimiento y evaluación del segmento mediante Hematoxilina y Eosina, y teniendo en cuenta los hallazgos histológicos encontrados, se realizó tinciones especiales del segmento, seleccionando los tejidos de los animales por cada tratamiento.

La tinción diferencial utilizada en el estudio fue la coloración con alcian blue, que fue ajustada a un pH de 2,5-3,0; para detección de glucógeno y carbohidratos (Mesias y Orbes, 2016). De igual forma el corte de tejido fue enviado para realizar coloración de Gram y así evidenciar la colonización del BAL en intestino.

Estos procedimientos se realizaron en el laboratorio de histopatología de la Universidad Nacional en la ciudad de Bogotá, Colombia.

6.13.2.2 Actividad y características de las vellosidades intestinales.

Se establecieron parámetros microscópicos como hiperplasia de caliciformes, hiperplasia glandular, hiperplasia de epitelio, atrofia de vellosidades, fusión de vellosidades, muerte celular,

cambios inflamatorios y metaplasia. Para lo anterior se observaron las láminas de cortes histológicos coloreados con hematoxilina-eosina (Ross 2012).

La evaluación de la producción de mucina intestinal se realizó mediante marcación de las células caliciformes. Las muestras de intestino se procesaron por los métodos de rutina para microscopía de luz y las secciones histológicas (3-4 μm de grosor) se colorearon con alcian blue ajustada a un pH de 2,5-3,0. La cuantificación de células se realizó siguiendo la metodología de conteo mitótico y celular citada en Meuten (2017), determinando el número de células productoras de IgA en 2.37mm² de Galtt.

Las fotografías de los micropreparados se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i, camera infinity y el software ImagePro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

6.13.3 Microscopia electrónica de barrido

Las muestras del segmento conservado en alcohol al 90° se analizaron mediante la técnica del Laboratorio de Microscopia electrónica en laboratorio PAW de patología veterinaria, ciudad de Bogotá, utilizando el protocolo para el procesamiento de este tipo de muestras definido por dicho Laboratorio. Se tomó registro fotográfico para evidenciar el resultado.

6.14 Respuesta bioquímica, inmunológica de los pollos de engorde y microscopia electrónica del intestino delgado.

6.14.1 Determinación de parámetros bioquímicos (triglicéridos, colesterol y proteínas totales).

Las proteínas totales se determinaron por refractómetro adicionando una gota del plasma sanguíneo sobre el lente del equipo y observando la escala de referencia. Las otras técnicas de bioquímica clínica se realizaron de acuerdo a lo explicado en el inserto de cada prueba.

6.14.2 Identificación de la respuesta inmune asociada a marcadores y/o inmunoglobulinas.

Ensayo preliminar para validar en aves, según Zambrano-Mora, Jurado-Gómez y Chavez-Velasquez, teniendo en cuenta la técnica inmunohistoquímica usada en humanos.

Esta nueva técnica se utilizó para evaluar la expresión de IgA en las células de origen linfoide en la lámina propia de intestino de las aves. Previamente se verificó la afinidad del anticuerpo que generalmente es usado en mamíferos, empleándola en tejidos de aves para identificar la presencia de las células productoras de IgA. Para ello, se realizó un ensayo tomando cortes de intestino delgado e intestino grueso y el procedimiento de inmunomarcación se realizó en Immunotech Laboratory en la ciudad de Bogota (figura 3).



Figura 12. Toma de muestras para inmunohistoquímica.

Además se realizaron cortes de intestino delgado, los cuales se ubicaron en bolsas de cierre hermético con alcohol a 90°, para la evaluación posterior de los tejidos por microscopía electrónica de barrido.

La inmunohistoquímica corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Se utilizan diferentes tipos de anticuerpos los monoclonales y policlonales; los primeros logran aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica, al contrario de los policlonales, los cuales pueden presentar en algunos casos una reacción inespecífica. (Rosenberg, *et al.*, 2011).

Para este procedimiento se emplearon marcadores monoclonales inmunohistoquímicos para IgA (de uso en humanos) a los bloques de parafina del tracto gastrointestinal de los animales y cuantificar las células que inmunomarcaron para producción de IgA en cada tratamiento. La cuantificación de células se realizó siguiendo la metodología de conteo mitótico y celular citada en Meuten (2017) determinando el número de células productoras de IgA en 2.37mm² de Galtt.

6.14.3 Respuesta post vacunal a Gumboro, New castle y Bronquitis.

La vacunación se realizó en la planta de incubación al pollito de 1 día. Las vacunas aplicadas fueron New castle, Bronquitis y Gumboro. Se realizó toma de muestra de sangre a los 35 días, en el momento del sacrificio. El suero se separó, congelo y envió al laboratorio Pronavicola, del municipio de Palmira (Valle). Los sueros fueron evaluados por las técnicas de Inmunohemaglutinación (New Castle, bronquitis) y Elisa (Gumboro), de esta manera se determinó la persistencia de los anticuerpos en los diferentes grupos de estudio.

6.15 Análisis del efecto de exclusión competitiva.

Las mezclas de exclusión competitiva (MEC) son un complejo de microorganismos, nutrientes y factores del hospedero que excluyen selectivamente géneros específicos de

microorganismos que colonizan el tracto digestivo y provocan enfermedades (Blankenship, *et al.*, 1993; Gusils, *et al.*, 1999; Laurencio *et al.*, 2005). Las MEC constituyen una perspectiva con muy buenos resultados dentro de los probióticos para aves. En la actualidad se aplican diversos productos de exclusión competitiva en la crianza de aves, ejemplos de los cuales son: AVIFREE (cultivo de exclusión competitiva único fabricado a partir de bacterias intestinales liofilizadas), BROILACT, AVIGUARD y PREEMPT, que han demostrado una alta eficiencia como probióticos, tanto desde el punto de vista de su contribución a la reducción de patógenos intestinales, como en la elevación de los indicadores productivos en las aves de cría. (Corrier, *et al.*, 1998).

En este contexto, se determinó el número de microorganismos en los siguientes medios específicos para su crecimiento y recuento: Agar MRS para bacterias ácido lácticas y petrifilm 3M para coliformes totales y *E.coli*. Los conteos microbianos se realizaron de acuerdo a la técnica de las diluciones seriadas y siembra en placas.

Para este análisis se realizó una prueba preliminar descrita con anterioridad y en la que se tomó cuatro pollitos de un día del mismo lote del grupo recibido para la investigación, con el fin de verificar si el pollito trae o no microbiota en su sistema digestivo. Al final del ensayo se realizó este mismo procedimiento con 2 animales por replica, para verificar y cuantificar la implantación del lactobacilo y la presencia y cantidad (UFC/mL) de *E. coli* y coliformes.

6.16 Análisis estadístico.

6.16.1 Tamaño de la muestra.

La presente investigación es de tipo experimental. En este contexto, se evaluó una población de 300 pollos de engorde machos de la línea Ross 308 AP de un día de edad. Estas aves se recibieron y se instalaron en un galpón adecuado ubicado en la Clínica Veterinaria Carlos Martínez Hoyos, de la Universidad de Nariño; aquí permanecieron un ciclo de producción de 35 días, bajo condiciones estandarizadas de manejo zootécnico y veterinario.

6.16.2 Variables del estudio.

En este diseño se aplicarán para las siguientes variables

6.16.2.1 Variables cuantitativas.

- Para en encapsulado: Viabilidad, eficiencia de encapsulación, solubilidad, humectabilidad, humedad.

-Suministro del probiótico.

-Parámetros zootécnicos: consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia.

-Parámetros bioquímicos: triglicéridos (mg/dl), colesterol (mg/dl) y proteínas totales (g/dl).

-Número de células caliciformes.

-Número de células con marcación en la inmunohistoquímica.

- Títulos de anticuerpos.

6.16.2.2. Variables cualitativas.

-Cambios microscópicos del tracto gastrointestinal de los pollos, patrón de distribución de las lesiones, severidad de las lesiones, tipo de alteración, hallazgos histológicos.

Para la caracterización histológica de intestino delgado se tomaron fotografías de los cortes histológicos con sus tinciones y se analizará la morfología de las microvellosidades.

6.16.3. Diseño del experimento.

Las variables cuantitativas se evaluarán bajo un diseño completamente aleatorizado (DIA), con 5 tratamientos (60 aves en cada uno), 3 repeticiones por tratamiento (20 aves en cada repetición).

Para los análisis a realizar se tomó de manera aleatoria 2 muestras por repetición, para un total de 6 muestras por tratamiento (tabla 11).

Tabla 10. Diseño de los tratamientos y muestreo.

TRATAMIENTOS	Repeticiones	Animales	muestras	Total de muestras
T0 Alimento concentrado sin antibióticos ni anticoccidiales.	3	20	2	6
T1 Alimento concentrado con antibiótico y anticoccidial	3	20	2	6
T2 Alimento concentrado más Probiótico comercial.	3	20	2	6
T3 Alimento concentrado más <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulado.	3	20	2	6
T4 Alimento concentrado más <i>Lactobacillus casei</i> sin microencapsular.	3	20	2	6
TOTAL				30

6.16.4. Paquetes estadísticos.

La recolección e información de datos se realizó en el programa Microsoft Excel® y el análisis de los datos mediante los procedimientos PROC UNIVARIATE y PROC GLM del paquete SAS (SAS 2015).

6.16.5. Hipótesis

El suministro de *Lactobacillus casei* microencapsulado con la técnica de Spray Drying tiene efecto significativo sobre morfología intestinal, respuesta inmunológica, parámetros bioquímicos, y productivos en pollo de engorde ross 308 AP.

7. Resultados Y Discusión

7.1 Ensayo preliminar

En la tabla 11 y figura 13 se observa los resultados microbiológicos obtenidos en 4 aves de un día de edad.

Tabla 11. Resultados de ensayo microbiológico preliminar en pollitos de 1 día.

Ave	Colonias compatibles con <i>Lactobacillus</i> sp	Coliformes totales. UFC/mL	<i>E. coli.</i> UFC/ml
1	Presencia	13.000	0
2	Ausencia	4700	0
3	Ausencia	0	0
4	Ausencia	0	0

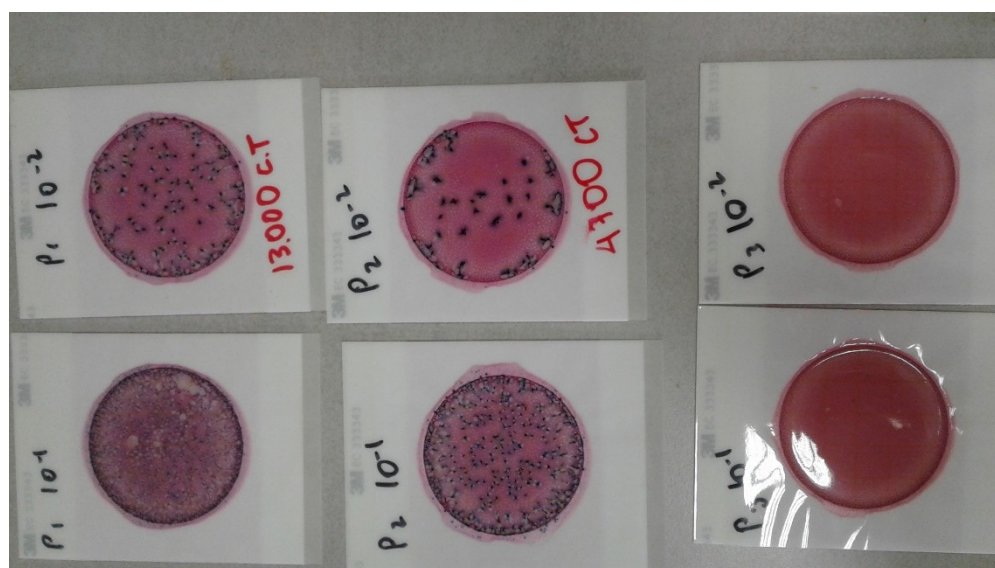


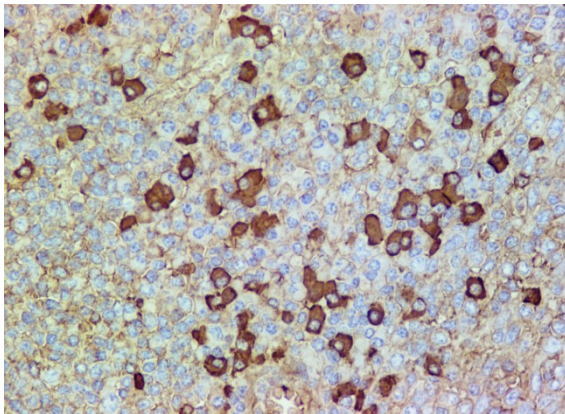
Figura 13. Resultados de pruebas microbiológicas.

Los resultados indican que la presencia del género lactobacilos solo se encontró en uno de los animales evaluados, esto muestra la baja presencia inicial de cepas lácticas en el tracto digestivo de las aves. Al respecto Hilmi et al. (2007) encontró en pollos de una semana una elevada variedad de especies de lactobacilos, sin embargo, la identificación fue realizada

mediante marcadores moleculares, y al finalizar la primera semana, lo que pudo influir el ambiente y la alimentación.

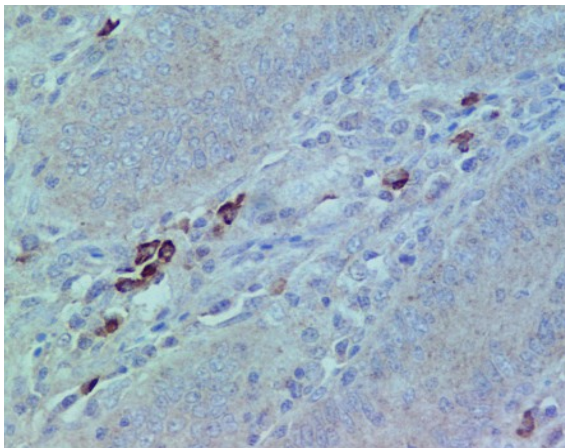
No se observó presencia de *E. coli* en ninguno de los pollitos, lo que demuestra que su manipulación y cuidado durante las primeras fases fueron buenas.

En la figura 14 se observa lo resultados para la inmunohistoquímica, se evidenció que el anticuerpo usado para mamíferos dio un marcaje positivo en las células intestinales de las aves, por lo que se puede usar este reactivo en la detección de las células productoras de IgA en los grupos estudiados.



1-Control positivo nudo linfático tejido humano

Células de color marrón que inmunomarcaron para IgA



Inmunomarcación en intestino de ave: ensayo preliminar

Figura 14. Marcación inmunohistoquímica. Fuente: el autor.

En la figura 14 se observa la lámina de inmunohistoquímica, se evidenció que el anticuerpo usado para mamíferos dio un marcaje positivo en las células intestinales de las aves, por lo que se puede usar este reactivo en la detección de las células productoras de IgA en los grupos estudiados.

7.2 Resultados del ensayo final.

Las fotografías A y B de la figura 15 permiten visualizar la morfología microscópica y macroscópica de *L. casei* respectivamente. Se evidencia la forma de bastón de *L. casei* en la fotografía A, que es el tipo de forma esperada para esta cepa bacteriana. De igual manera, se aprecia la forma redondeada de las colonias de *L. casei* en un cultivo agar MRS.

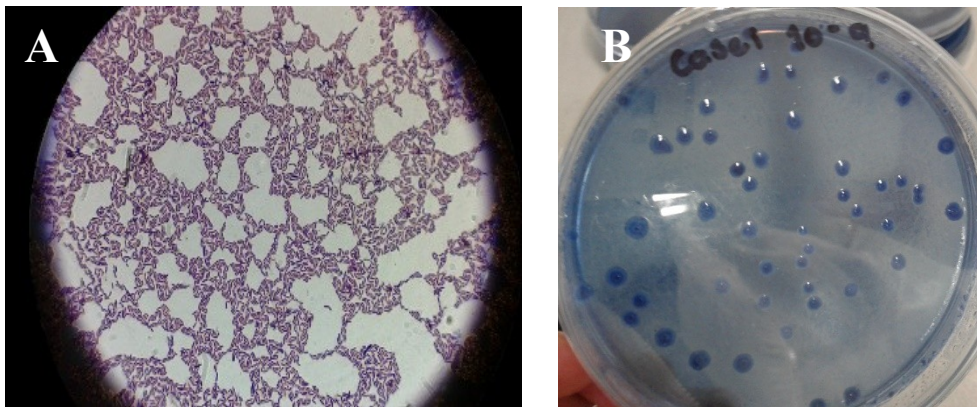


Figura 15. Morfología de *L. casei*. A: morfología microscópica; B: morfología macroscópica. Fuente el autor.

Las pruebas de catalasa y gas resultaron negativas. Las bacterias ácido lácticas son consideradas catalasa negativas, por lo que los hallazgos son coherentes con los reportes de la literatura (Federic et al. 2015). Por otra parte, la producción de gas de algunas cepas probióticas es una condición que puede desencadenar procesos entéricos y afectar de manera significativa los sistemas de producción, para ello, se selecciona cepas que sean negativas a esta característica con

el fin de evitar los problemas a que conlleva (Gamboa et al., 2011). Los resultados obtenidos demuestran que *L. casei* dentro de los procesos no produce gas como consecuencia de su metabolismo o este es producido en mínimas cantidades, lo que incrementa la viabilidad de esta cepa como agente probiótico.

7.2.1 Viabilidad del *L casei* a diferentes temperaturas.

El crecimiento de la bacteria fue de 3×10^{12} y 4×10^{12} UFC/150 μ L a 37 y 45°C respectivamente. En estudios realizados por Grudson et al. (2008) y Hunter et al. (2012) se encontró crecimientos por encima de los 3×10^{10} y 2×10^{12} UFC/mL a temperaturas de 38 y 42°C respectivamente, lo que demuestra el adecuado crecimiento obtenido por la cepa en el presente estudio.

Las aves tienen una temperatura interna promedio de 41°C (Hugson et al. 2017), por lo que los resultados de crecimiento a 45°C es un indicativo de la viabilidad de *Lactobacillus casei* a las condiciones internas de las aves, lo que incrementa la probabilidad de sobrevivencia de la cepa bajo estas condiciones.

7.3 Microencapsulación de *L casei* por la técnica de Spray Drying (secado por aspersión)

7.3.1 Viabilidad

Los resultados de la microencapsulación se observan en la tabla 12 y 13. La viabilidad del microencapsulado fue buena a los 22 días (75,94%), lo que señala que la técnica de microencapsulación fue efectiva y podría ser una alternativa para su uso en campo. Otras investigaciones muestran una viabilidad de 67% a los 15 días de microencapsulada la cepa probiótica y que fue administrada por aspersión (Aldemar et al. 2014). Los resultados del

microencapsulado en estos ensayos permiten inferir una mayor conservación de la cepa probiótica durante largos periodos de almacenamiento.

La viabilidad de la cepa dentro del microencapsulado es un factor importante para la conservación de la bacteria, de otra forma, muchas de la células se verían afectadas por las condiciones gastrointestinales de los animales a los cuales se las suministra, lo que reduce la correcta colonización del huésped (Gonzales et al. 2015).

En el estudio realizado por Dimitrellou et al. (2016) se demostró que la viabilidad del microencapsulado fue del 89% y redujo de manera significativa la pérdida de *L. casei* luego de someterlo a jugos gástricos. Estos resultados apoyan la idea, de que la microencapsulación realizada tendrá un efecto benéfico para la utilización de la cepa probiótica en condiciones comerciales.

Tabla 12. Parámetros físicos del microencapsulado.

Factor	Valor obtenido %	Tiempo (d)
Viabilidad	75,94	20
Eficiencia	89,36	20

7.3.2 Eficiencia.

El resultado se puede observar en la tabla 12. Parra (2010) menciona que la eficiencia para la técnica evaluada debe estar entre 96 a 100%, lo que muestra una menor porcentaje de eficiencia en el microencapsulado obtenido, probablemente a causa del equipo usado para la microencapsulación; sin embargo, el mismo autor menciona que la estructura de la pared y las condiciones de producción del microencapsulado (temperatura, pH, presión, humedad) tienen un efecto significativo sobre la eficiencia. Al respecto, el estudio realizado por López et al. (2008) mostró una eficiencia del 87% utilizando la misma técnica, lo que podría indicar que los valores

que se han encontrado están dentro de lo esperado para la técnica. Lao-Se et al. (2014) realizaron mediciones de eficiencia en *L. lactis* y encontraron valores del 90 y 91% utilizando la técnica de spray drying, con resultados similares a los hallados en este estudio, lo que demuestra la preservación de la cepa probiótica con esta técnica.

7.3.3 Variables físicas del microencapsulado.

Para el caso de las variables físicas, los resultados se pueden observar en la tabla 13. Se encontró una humedad menor a los 35 días de evaluación, que se encuentra cercano con los parámetros reportados por Paez (2013), quien menciona que el porcentaje de humedad en un microencapsulado debe encontrarse en un rango de 3,5 a 4%. La importancia de la variable radica en la influencia sobre la viabilidad de la cepa microencapsulada y el tiempo de vida útil que puede mantenerse estable el material encapsulante sin ser alterado o digerido por otro tipo de bacterias, lo que desencadenaría la liberación de la cepa y su exposición al medio circundante (De-Prisco & Mauriello, 2016). De esta manera, en condiciones gastrointestinales, la cápsula no sería efectiva para evitar el contacto con los fluidos ácidos del estómago y disminuiría de manera considerable la población de bacterias probióticas que llegan al intestino delgado (Shori, 2017).

De esta manera, los resultados encontrados son favorables para la conservación del microencapsulado, sin embargo, se debe mejorar este parámetro al día 22 donde la humedad tiene un valor muy elevado, lo que puede alterar la eficacia de la microencapsulación.

En cuanto a la actividad del agua (A_w), los resultados están dentro de lo establecido por Montes (2013), quien menciona que este parámetro debe estar alrededor de 0,3 para evitar el uso de agua por parte de otros microorganismos presentes en el ambiente y que puedan deteriorar la cápsula. La misma autora encontró valores de 0,32 y 0,38 en el microencapsulado, utilizando la

misma técnica y los mismos materiales encapsulantes, lo que indica una técnica adecuada para la microencapsulación de bacterias lácticas como *L. casei*.

Tabla 13. Variables microencapsulado a temperatura ambiente.

Factor	Valor obtenido	Tiempo (d)
Humedad relativa	13,845	22
	5,228	35
Actividad de agua	0,353	22
	0,407	35
Humectabilidad	3:08 min	12
	2:24 min	31
Solubilidad	96%	20

En cuanto a la humectabilidad, los resultados muestran un tiempo adecuado para la microencapsulación, ya que Montes (2013) indica que tiempos por debajo de 2 minutos disminuyen la viabilidad del microencapsulado, ya que una lenta rehidratación mejora la viabilidad y maximiza la recuperación celular; sin embargo, autores como Di-Batista (2016) menciona que humectabilidad por encima de los 5 minutos también puede presentar problemas como materiales microencapsulantes. Con todo lo anterior, se puede determinar que los valores de humectabilidad muestran que la metodología tiene buenos resultados para este parámetro.

La solubilidad se encuentra relacionada con la capacidad del microencapsulado para disolverse en el agua y tiene una repercusión sobre la viabilidad de las cepas microencapsuladas, ya que una inadecuada disolución daña las células bacterianas que resultaron lesionadas durante el proceso de microencapsulación (Sanchez 2016, Montes et al. 2016). Los resultados de autores como Montes et al. (2016) mostraron una viabilidad del 96,99 a 98,99% en cepas de *L. rhamnosys* y *L. casei* microencapsulados, que se encuentran cercanos del valor de 96% encontrado por esta investigación. Esto demuestra que la técnica utilizado para microencapsular tienen buenos resultados para *L. casei*.

7.3.4 Caracterización física y tamaño de poro por microscopia electrónica de barrido.

Se encontró tamaños de 3.47 y 17.81 μm del microencapsulado (figura 16 y 17). Anderson et al. (2016) mostraron un tamaño entre los 3 y 8.5 μm mediante la técnica por aspersión (spray drying), valores similares a los encontrados en esta investigación, por lo tanto los tamaños se consideran adecuados para el tipo de técnica utilizada.

El tamaño observado por De Araújo (2016) fue de 7 a 15 μm , con morfología circular y partículas irregulares en *Lactobacillus delbruekii* sub. *bulgaricus*. Por otra parte, Montes et al. (2000) tuvieron tamaños de 6.33 μm que se consideran pequeños para la técnica de secado por aspersión. La variación en el tamaño de las partículas dependen del material inicial de alimentación y de las condiciones presentes en el secado (Esquivel et al. 2015).

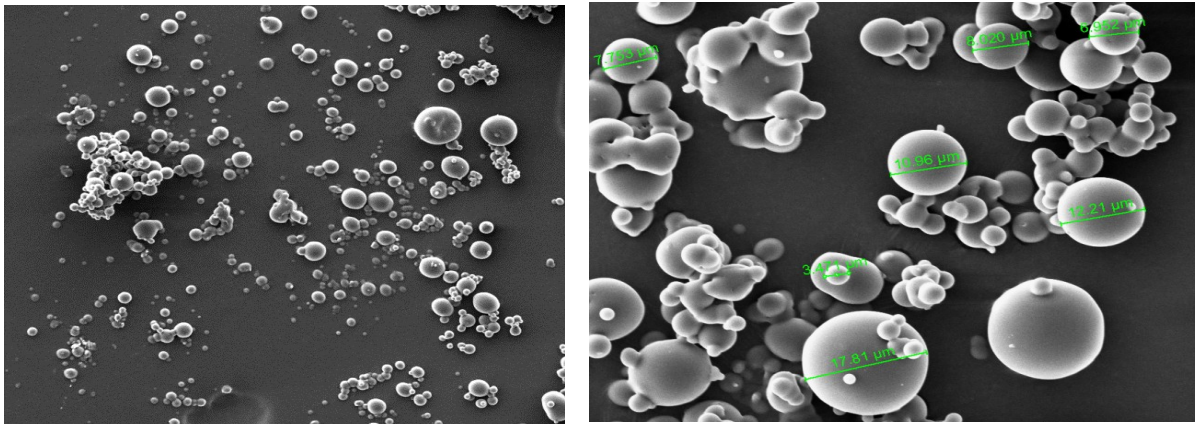


Figura 16. Fotografía con microscopia de barrido de *L. casei* microencapsulado por la técnica de Spray Drying. Fuente: el autor.

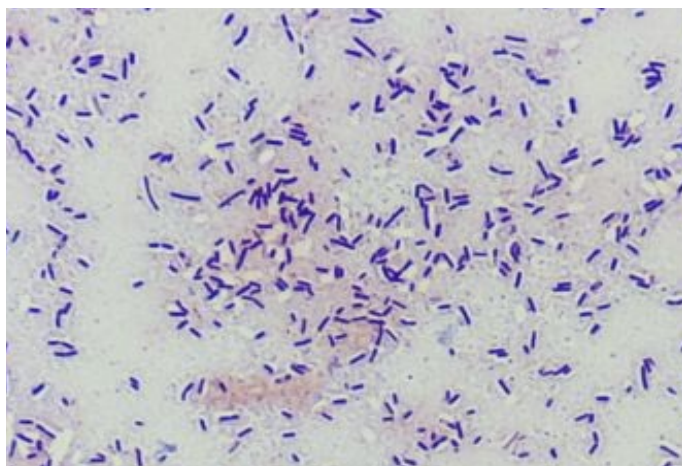


Figura 17. Bacteria microencapsulada vista al microscopio óptico. Coloración de Gram.

De acuerdo con Rodríguez et al. (2010) el tamaño del microencapsulado influye en la calidad del producto final; a mayor tamaño del encapsulado (valores que superan los 100 μm) mayor es la posibilidad de presentar dificultades en la liberación de la cepa durante el tránsito por el tracto gastrointestinal. Los mismos autores mencionan que los microencapsulados se pueden clasificar en polvo y partículas mayores; las primeras se encuentran entre 1 y 100 μm y las segundas en valores de 2 a 3 mm. Por otra parte, autores como Villena et al. (2012) indican que el tamaño ideal del microencapsulado está entre los 15 y 100 μm . De acuerdo con esto, los resultados obtenidos clasifican al microencapsulado en la categoría de polvo, presentación adecuada para los fines del proceso, sin embargo, también se encontró tamaños inferiores a los 15 μm que podría afectar el microencapsulado, ya que presentan empaquetamiento deficiente de la cepa y una reducción de su viabilidad (Villena et al. 2012).

7.4 Viabilidad a pH 3 y diferentes concentraciones de bilis y sales biliares de *L. casei* microencapsulado.

En este estudio el crecimiento de *L. casei* a pH 3 fue de 3.0×10^{11} UFC/150 μL (tabla 14), comparado con los resultados obtenidos por Jarrín-Jarrín et al. (2015) en *Lactobacillus*

plantarum, fueron similares ya que en este último estudio se observó crecimientos de 2.4×10^{11} UFC/uL. Al respecto Calpa et al. (2011) mencionan que las bacterias ácido lácticas por sus condiciones metabólicas puede crecen en condiciones ácidas, lo que apoya los resultados obtenidos. Por otra parte, Fajardo et al. (2017) que encontraron crecimiento de 3.5×10^{12} UFC/150 uL en cepas de *L gasseri* a un pH 2.

Tabla 14. Crecimiento a pH 3.

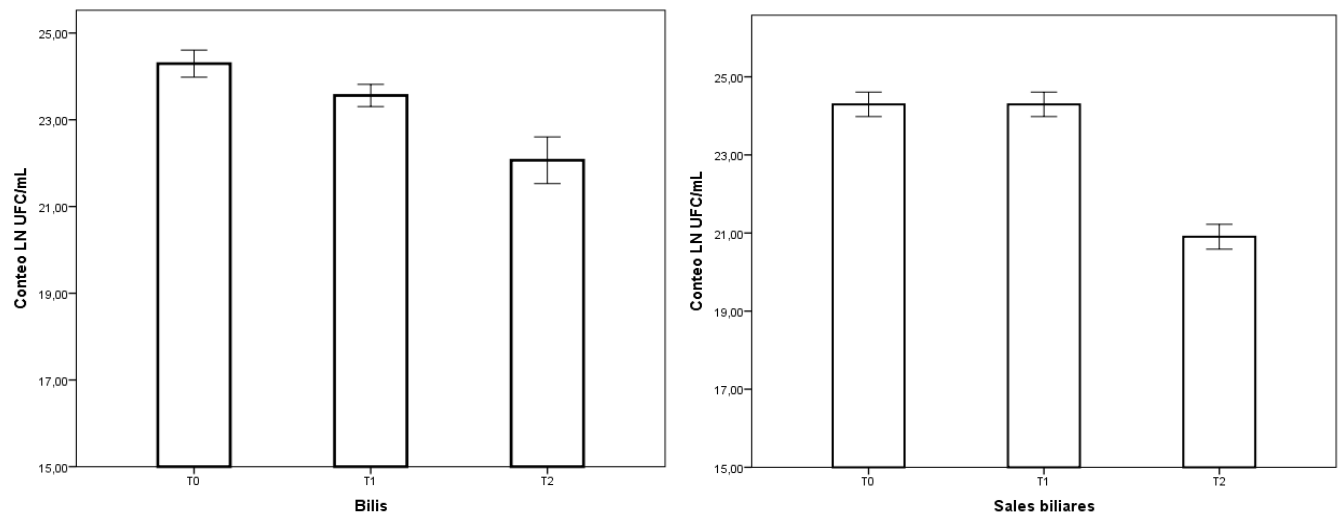
pH 3,0	24 horas
UFC/150 μL	3.0×10^{11}

Ramírez et al. (2010) manifiestan que la resistencia a pH bajo por parte de las cepas probióticas, les permite atravesar con mayor facilidad el ambiente ácido del estómago glandular de las aves. Por otra parte, los resultados del crecimiento de la cepa microencapsulada demuestran que la técnica influyó de manera positiva sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei*. En el estudio realizado por Hungd et al. (2008) el crecimiento del microencapsulado en condiciones ácidas de *L. delbruekii* fue de 2.1×10^7 UFC/ μ L, valor inferior a lo encontrado en esta investigación. Chou & Weimer (1999) indican que los organismos probióticos microencapsulados pueden resistir al menos 90 min a pH ácido, lo que garantiza su crecimiento en el tracto gastrointestinal y permite una protección adecuada para el fin que se realizó.

Los resultados para bilis y sales biliares se pueden observar en la figura 18. El crecimiento fue diferente para las muestras evaluadas ($p < 0.05$). La resistencia de *L. casei* a la exposición a bilis mostró que hay un mayor crecimiento en el tratamiento testigo (T0, sin bilis) y el menor crecimiento en el tratamiento T2 (con bilis al 0,5%). Chen-Chen et al. (2008) mencionan que la resistencia a la bilis es un factor importante para determinar la viabilidad de una cepa probiótica;

y que crecimientos por encima de 1×10^9 UFC/mL (20.7 LN UFC/mL) se consideran adecuados para una correcta colonización del tracto gastrointestinal. Los resultados observados para *L. casei* demuestran que todos los tratamientos tuvieron crecimientos superiores a los reportados, a pesar de observarse diferencia entre las concentraciones, lo que garantizaría una adecuada colonización del tracto digestivo.

Figura 18. Crecimiento para bilis y sales biliares. Para bilis T0 testigo, T1 0,3% y T2 0,5%;



para sales biliares T0 testigo, T1 0,3% y T2 1%.

Los resultados observados en estudios realizados por Jurado et al. (2015) y Jurado et al. (2017) muestran que *L. casei* como *L. gasseri* tienen un adecuado crecimiento a concentraciones de 0,5% de bilis y ayudan a una mejor colonización del tracto gastrointestinal. En estos estudios se encontró crecimientos de 23 Ln UFC/mL y 22,7 Ln UFC/mL, valores cercanos a los observados en los tratamientos de este estudio.

Comparando los resultados con los obtenidos por De Araújo (2008) en su estudio mediante la técnica de secado por aspersión sobre *Lactobacillus delbruekii* sometidos a concentraciones de bilis al 1% obtuvo crecimientos de 6.56 Ln UFC/g. Esto demuestra la alta viabilidad observada en el crecimiento obtenido en el presente estudio.

La microencapsulación no solamente mejora la resistencia de la bacteria a condiciones gastrointestinales, sino que también mejora su viabilidad al someterse a condiciones de temperatura y almacenamiento, asegurando su acción en el intestino. Según menciona Mohammad et al (2017) la supervivencia de las BAL aumenta después de la microencapsulación con zeolita- almidón con el método de extrusión. La técnica empleada para encapsular y el número de días de almacenamiento podrían haber disminuido el crecimiento de las bacterias microencapsuladas y pudo tener un efecto sobre los parámetros de viabilidad.

Para las sales biliares se observó que el tratamiento con una concentración de 1% mostró el menor crecimiento con un valor de 19,3 LN UFC/mL; este crecimiento fue muy cercano al necesario para una correcta colonización (20.7 LN UFC/mL).

7.5 Viabilidad de *L casei* en los alimentos concentrados.

7.5.1 Evaluación de la viabilidad del *L casei* sin microencapsular por la técnica de aspersión.

Esta evaluación se analizó por cuanto uno de los tratamientos implicaba utilizar *L casei* sin microencapsular en el alimento concentrado. Los resultados de la viabilidad de *L casei* en el concentrado inoculado se puede ver en la siguiente tabla 15.

Tabla 15. Viabilidad de *L. casei*.

DIA	3	6	9	15
UFC/ 150 uL	2×10^{14}	3×10^{14}	3×10^{14}	2×10^{14}

Los resultados concuerdan con lo encontrado por Jurado (2010) quién evaluó *L. plantarum*, lo que permiten afirmar que el suministro de la bacteria en el alimento balanceado fue suficiente

para que el Lactobacilo sobreviviera a las condiciones del tracto gastrointestinal y se implantara adecuadamente en el mismo. De igual manera autores como Darjani et al. (2016) demostró que *L. casei* muestra crecimientos cercanos de 4×10^{12} luego de ser conservado por un periodo de 30 días. Los resultados que se observó son mayores a este reporte, reforzando la idea de la viabilidad de la cepa láctica suministrada a los pollos y con ello, se garantizó la adecuada concentración de bacterias en el alimento balanceado como para colonizar el tracto digestivo de las aves.

7.5.2 Evaluación de la Inclusión del probiótico comercial.

Al realizar el estudio de la carga microbiana del probiótico comercial se obtuvo el siguiente resultado. A las 24 horas de haber mezclado el producto en el agua según lo que indica el fabricante para el suministro a las aves, se realizó cultivo de 1 mL y se obtuvieron cargas microbianas expresadas en UFC/ mL de 9×10^{12} ; lo que permite verificar que el producto si contenía el probiótico.

7.6 Evaluación *in vivo*.

Los resultados obtenidos para la evaluación *in vivo* se pueden observar en la tabla 16. Sin embargo, se observó que el tratamiento T1 (concentrado comercial con adición de antibióticos y anticoccidiales) presenta dificultades en la interpretación general del estudio debido a que no se pudo elaborar un alimento concentrado que tuviera en su composición con antibiótico y anticoccidial con una fórmula nutricional fuera a la de los otros tratamientos. Esto contribuyó a introducir un sesgo en la evaluación y no permitió una comparación justa entre los tratamientos. En los estudios realizados por Salvador , et al (2012); Gutierrez, et al (2013) y Samaniego et al (2009) realizan la evaluación únicamente comparar los probióticos con un tratamiento testigo (sin probióticos) lo que permite una comparación más efectiva y estadísticamente más adecuada.

Dado lo anterior, se tomó la decisión de sacar el T1 (comercial con antibiótico y anticoccidial) del análisis estadístico y evaluar únicamente los otros cuatro tratamientos.

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos.

Variable	T0	T1	T2	T3	T4
GP (g)	181,2	634,02	240,4	282,4	175
Consumo (g)	4403	7067,3	4313,3	5630	3836,3
CA	4,39	1,60	3,21	3,54	4,24
Colesterol mg/dl	158,8	164,3	161,5	170	191,6
Triglicéridos mg/dl	116	40,17	115,5	92,5	91,8
Proteínas plasmáticas totales g/dl	3,48	3,45	3,77	3,57	4,13
<i>Lactobacillus casei</i> UFC/mL	$9,5 \times 10^5$	$9,4 \times 10^6$	$2,84 \times 10^7$	$1,87 \times 10^7$	$2,36 \times 10^7$
Coliformes totales UFC/mL	66600,7	399,8	55666,7	4500	2833,3
Newcastle títulos* HI	2,5	3,3	10	5	17,5
Gumboro títulos* Elisa	520	85,16	156	234	567
Bronquitis títulos* HI	3	3	3	11,5	7,5

* Promedios títulos obtenidos. HI: inhibición de la hemaglutinación.

7.6.1 Parámetros productivos.

Los resultados para las variables productivas sin el tratamiento T1 (antibiótico y anticoccidial) se observan en la tabla 17.

Tabla 17. Parámetros productivos a los 35 días de edad.

Variable	T0	T2	T3	T4
GP (g)	181,2± 31.04 ^b	240,4±17.94 ^{ab}	282,4±66.03 ^a	175,0±24.3 ^b
Consumo (g)	4403,0±407.7 ^b	4313,3±283.34 ^b	5630,0±289.32 ^a	3836,3±301.21 ^b
CA	4,39±0.07 ^a	3,21±0.17 ^a	3,54±0.27 ^a	4,24±0.34 ^a

T0: testigo; T2: probiótico comercial; T3: *L. casei* microencapsulado; T4: *L. casei* sin microencapsular.

La ganancia de peso (GP) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre T3 (*L. casei* microencapsulado) y los tratamientos T0 y T4 (testigo y *L. casei* sin microencapsulación, respectivamente), demostrándose que la cepa microencapsulada mejoró este parámetro (tabla 17).

Sin embargo, la comparación con el probiótico comercial (T2) no mostró diferencia con los tratamientos, lo que indica que a pesar de observarse bajos rendimientos en los tratamientos T0 y T3, sus resultados son similares a los obtenidos con un producto comercial. Al respecto, Gangon et al. (2013) encontraron ganancias de peso de 1800 g durante la fase de cría de pollos Ross, que fueron evaluados con una cepa de *L. casei* sin microencapsular en el suplemento que llenaba completamente los requerimientos nutricionales de los animales. Como se mencionó al inicio de la presentación y discusión de los resultados para el ensayo *in vivo*, los requerimientos nutricionales de los animales no fueron llenados por el concentrado suministrado, factor que se evidencia en los resultados obtenidos.

En cuanto al Consumo, el tratamiento T3 (*L. casei* microencapsulado) mostró un valor mayor (5630 g) en comparación con los otros tratamientos, lo que indica que la cepa microencapsulada mejoró el consumo. Esto es importante para los sistemas de producción, ya que el incremento en el consumo, permite mejorar otros parámetros zootécnicos que se encuentran relacionados (Hunter et al. 2000). Los consumos mostrados son similares a los reportados por otros estudios (Candar et al. 2001, Fernandez et al. 2013), lo que demuestra que a pesar de las diferencias estadísticas entre tratamientos, estos no se encuentran fuera de los parámetros estándar para pollos de engorde.

En cuanto a la conversión alimenticia, los resultados mostraron que no existen diferencias significativas. Esto indica que a pesar de encontrarse consumos de alimento y ganancias de peso distintas entre tratamientos, la conversión no fue afectada de manera significativa por estos

últimos. Al respecto, los reportes de Anderson et al. (2011) muestran conversiones por debajo de 1.9 en pollos Ross alimentados con una dieta con *L. plantarum* bajo condiciones controladas. Lo anterior evidencia una baja conversión en esta evaluación. Sin embargo, se debe recordar que las condiciones de alimentación para estos animales no fueron similares a los estudios realizados por otros autores.

Finalmente se observa que los parámetros productivos obtenidos por los tratamientos con *L. casei* microencapsulados son favorables para las condiciones de manejo de estas aves.

De igual manera, se debe tener en cuenta que la investigación está en el proceso de construcción de procesos biotecnológicos con BAL que puedan reemplazar el uso de los antibióticos y no está enfocada en un incremento de los parámetros productivos de manera directa. Al respecto, Lopez et al. (2000) mencionan que los probióticos y prebióticos son una alternativa potencial de reemplazo al uso de los antibióticos como promotores de crecimiento APC, estos últimos presentan la dificultad de tener trazas en carne y huevo destinados al consumo humano, generando graves problemas de resistencia en bacterias patógenas, que afectan la salud humana y animal (Vernard et al. 2000). Además se ha demostrado que el uso de probióticos contribuye al mantenimiento de la integridad y estabilidad de la microbiota intestinal, logrando así evitar proliferación de bacterias patógenas y ayudando a prevenir la aparición de enfermedades (Gandesh et al. 2010). Sin embargo, en cuanto a su capacidad para mejorar el rendimiento zootécnico, los resultados aún no son concluyentes debido a la gran cantidad de variables que tienen influencia en la efectividad del probiótico como la dosis, vías de administración, composición de las dieta, etapa de producción, entre otros (Chin-Sen et al. 2011).

Por otra parte, el uso continuo de estos aditivos ha incrementado la proliferación de cepas resistente a los antibióticos, generando problemas no solo para la salud animal, sino también para

la salud pública mundial (Molder et al. 2012). Por ello, las alternativas nutricionales de reemplazo de los APC cobran mayor preponderancia en las actuales condiciones, toda vez que disminuyen la proliferación de bacterias resistentes a antibióticos ya que mitigan los efectos del uso intensivo de estos aditivos (Portilla et al. 2009).

En el caso de las aves, la industria de alimentos balanceados utiliza los antibióticos a dosis subterapéuticas como promotores de crecimiento en la formulación de las raciones (Ancinar et al. 2007). Se ha evidenciado que el retiro de los APCs de la formulación puede tener un impacto negativo en el desempeño zootécnico de las aves.

En la Unión Europea, la adición de antibióticos como promotores de crecimiento en la producción de aves se viene regulando desde hace muchos años. La prohibición total de los antibióticos se dio a partir de 2006 (1 enero 2006), siendo el paso final para la eliminación definitiva de los antibióticos en esta zona. Los demás países apuntan a establecer la misma normatividad con el fin de reducir la incidencia de los antibióticos sobre la proliferación de cepas multiresistentes (Ronquillo & Hernandez, 2017; Cardigan et al. 2010)

De igual manera, a partir de 2019 en Brasil se emitió el decreto 3025-34 que prohíbe el uso de moléculas como promotores de crecimiento. Lo que genera mayor inestabilidad en los sistemas de producción. Al respecto, Venedicte et al. (2018) mencionan que el impacto sanitario de la eliminación de promotores de crecimiento en los pollos de engorde es alto, dado que la industria en zonas con bajo desarrollo tecnológico, no cuenta con las herramientas necesarias para hacer frente a los problemas de contaminación cruzada, y manejo de la bioseguridad en estos sistemas de producción.

Para el caso de Colombia, la industria avícola no viene avanzando en el control del uso de antibióticos, lo que demuestra una desventaja competitiva con industrias de otros países y que

dificulta la exportación de este tipo de productos hacia otras regiones del país, las investigaciones hasta el momento son incipientes y no permiten llegar a resultados concluyentes (FENAVI, 2018).

7.6.2 Bioquímica sanguínea.

Los resultados de los parámetros bioquímicos se pueden observar en la tabla 18. El colesterol mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre T4 (*L. casei* sin microencapsular) y los demás tratamientos. Sin embargo, este valor no excede los parámetros normales que se deben encontrar en aves. En los valores de triglicéridos y proteínas plasmáticas totales, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo se ve una disminución en los valores de triglicéridos de los grupos tratados con *L. casei*. (T3 y T4), con respecto a los otros tratamientos y un valor mayor en las proteínas plasmáticas del T4. Dichos valores aunque no representan diferencias estadísticas significativas pueden incidir en la salud y producción de las aves.

Al respecto, Castro et al. (2018) indica que el suministro de cepas probióticas no tienen un efecto concluyente sobre los parámetros sanguíneos y que falta mucho por entender si realmente existe una interacción entre estos y el organismo huésped. Por otra parte, los estudios realizados por Wang et al. (2019) en seres humano encontró una relación significativa e inversa entre la adición de *L. casei* y la concentración sérica de colesterol, demostrando que en algunos casos particulares se puede observar una reducción de estos valores.

Tabla 18. Parámetros bioquímicos.

Variable	T0	T2	T3	T4
Colesterol mg/dl	158,8±0,34 ^b	161,5±0,56 ^b	170,0±0,39 ^b	191,6±0,35 ^a
Trigliceridos mg/dl	116,0±0,45 ^a	115,5±0,51 ^a	92,5±0,31 ^a	91,8±0,42 ^a
Proteína total g/dl	3,48±0,03 ^a	3,77±0,04 ^a	3,57±0,06 ^a	4,13±0,08 ^a

T0: testigo; T2: probiótico comercial; T3: *L. casei* microencapsulado; T4: *L. casei* sin microencapsular.

7.6.3 Parámetros microbiológicos.

Se encontró mayor presencia de colonias con morfología de *Lactobacillus casei* en los tratamientos T3 y T4 (tabla 19). Los coliformes totales muestran que sólo hay una población representativa en el tratamiento T2 y T0.

Tabla 19. Colonias por ml presentes en muestra de intestino delgado en pollos de 35 días.

Variable.UFC x ml	T0	T2	T3	T4
<i>Con morfología de Lactobacillus casei</i>	$9,5 \times 10^5$	$2,84 \times 10^7$	$4,87 \times 10^7$	$3,36 \times 10^7$
Coliformes totales	66600,7	55666,7	4500,0	2833,3
<i>E. coli</i>	0	0	0	0

T0: testigo; T2: probiótico comercial; T3: *L. casei* microencapsulado; T4: *L. casei* sin microencapsular.

Según Villaraga (2016) las poblaciones innatas de BAL van en decrecimiento desde la semana 1 ($6,5 \times 10^3$) hasta la semana 6 ($2,3 \times 10^4$) y en este estudio se encuentra que *Lactobacillus casei* se instaló en duodeno con poblaciones de $1,37 \times 10^7$ (en aves que se les suministro el concentrado con microencapsulado) y $2,36 \times 10^7$ (en aves a las que se les suministro *L casei* no microencapsulado) por lo que se puede verificar la instalación de esta BAL después de su administración en las aves estudiadas.

Los recuentos de coliformes totales son bajos respecto al estudio de Villaraga (2016), en el cuál encontró en duodeno poblaciones de $6,6 \times 10^5$ UFC/mL en la semana 6 en pollos de línea Cobb, pero es de tener en cuenta que en este ensayo se trabajó con 250.000 pollos, una población que genera mucha más contaminación ambiental y por lo tanto endógena.

En el caso de *E. coli*, este estudio no encontró crecimiento de este microorganismo en las muestras procesadas lo que coincide con el estudio de Villaraga (2016).

Para el caso de *Streptococcus* sp, *Clostridium* sp. y *Bacteroides* sp., no se pudieron evidenciar porque a pesar de ser habitantes del duodeno en aves de engorde, requieren de medios de cultivo diferentes a los empleados y otras condiciones más exigentes para su crecimiento.

Por otra parte, se observa que el tratamiento T0, tuvo el mayor número de coliformes totales, en comparación con los otros tratamientos. El resultado de T1 se podría explicar por la composición del probiótico comercial, ya que además de las cepas probióticas, tiene otros componentes nutricionales que influirían en el crecimiento de las bacterias coliformes.

En cuanto a los recuentos de *L. casei* en los tratamientos inoculados con la cepa se puede verificar la instalación del probiótico en el tracto gastrointestinal de las aves. Al respecto, el estudio realizado por Gao et al. (2017) demostró que el suministro de bacterias probióticas (*L. casei*) en el alimento del pollo de engorde logró colonizar efectivamente el tracto digestivo de las aves.

7.6.4 Anticuerpos post vacunales

Se encontró una mayor seroconversión ante el antígeno vacunal para New Castle en el grupo con *L. casei* sin microencapsulado (T3) en comparación a los demás grupos. En el caso de Gumboro se evidencia una mayor seroconversión en los grupos testigo y *L. casei* sin microencapsular (T0 y T2), y el caso de bronquitis esta situación se presentó en los grupos con suministro de *L. casei* (T2 y T3) (figuras 19). Lo anterior permite inferir una protección más duradera con el suministro de la cepa probiótica, ya sea microencapsulado o no.

Al respecto, el uso de microorganismos probióticos es una gran ventaja para mejorar la protección de los lotes y permitiría evitar grandes complicaciones sanitarias con sus altos costos, dado que los estudios han evidenciado que organismos probióticos como el *Lactobacillus casei*

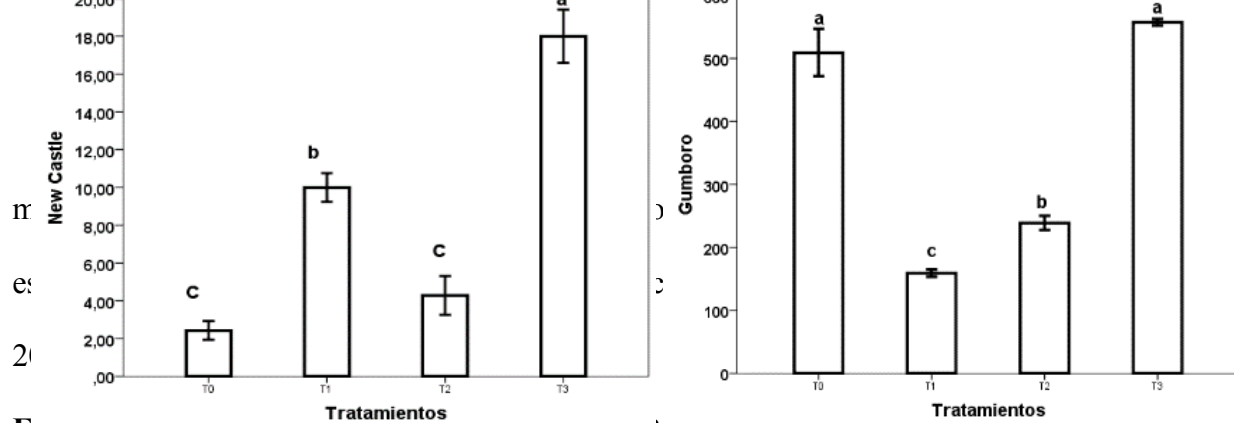
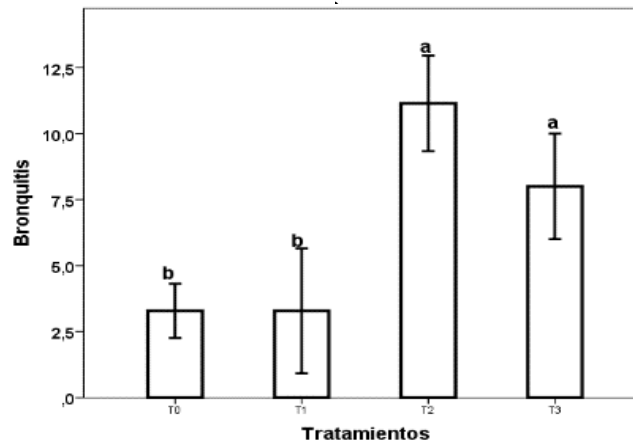


Figura 17. Virus de New Castle

En el T1 se emplearon otros microorganismos, una combinación de compuestos en comparación con los otros microorganismos ejercen



que incluye *L. casei*. En consecuencia, esta combinación de compuestos genera una respuesta inmune en el pollo, en consecuencia, el consorcio de bacterias en los aspectos analizados.

7.6.5 Resultados histopatológicos

En la figura 20 se puede observar la instalación de la bacteria en el intestino delgado de los pollos. Esto evidencia la sobrevivencia de las cepas suministradas (con y sin microencapsulación) al tránsito gastrointestinal y de manera indirecta el microencapsulado. Al respecto, Campana et al. (2017) encontró que las bacterias ácido lácticas tienen buenas habilidades para adherirse al epitelio intestinal y que esta característica les permite tener mayor control de los microorganismos patógenos que ingresan al huésped. Los mecanismos de las BAL en la carrera contra otras bacterias es multifactorial, sin embargo, se puede resaltar la exclusión competitiva, que consiste en competir por los receptores de adhesión presentes en la mucosa gastrointestinal (Gandhi & Shah, 2016). Por lo anterior, la instalación de *L. casei* en el intestino de los pollos es una muestra de la efectiva colonización de esta zona de la ave.

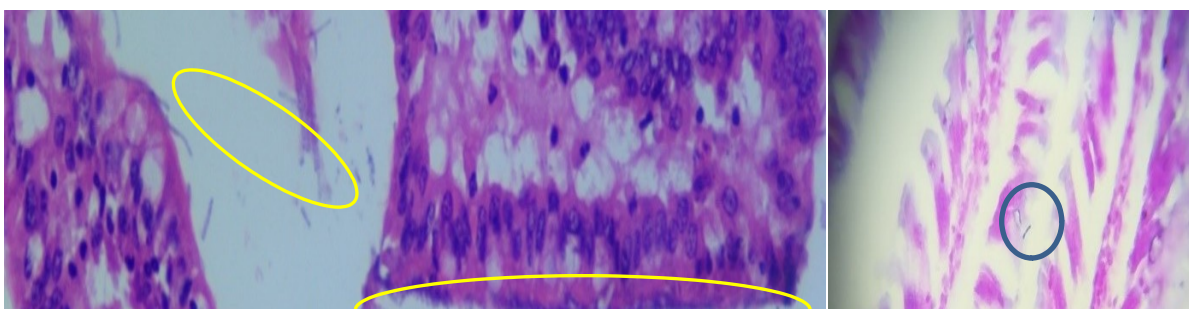




Figura 20. Corte histológico HE (derecha) y Gram (izquierda) con implantación de *Lactobacillus casei*. Bacilos largos señalados con círculos.

En las figuras 21, 22 y 23 se puede observar los hallazgos histopatológicos más importantes. Se encontró hiperplasia de caliciformes, hiperplasia glandular, hiperplasia de epitelio, atrofia de vellosidades, fusión de vellosidades, muerte celular y cambios inflamatorios.

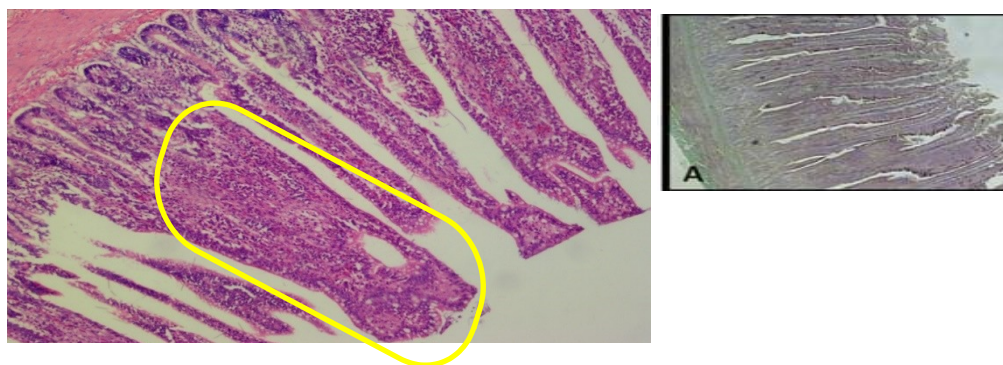


Figura 21. Hiperplasia de células caliciformes.

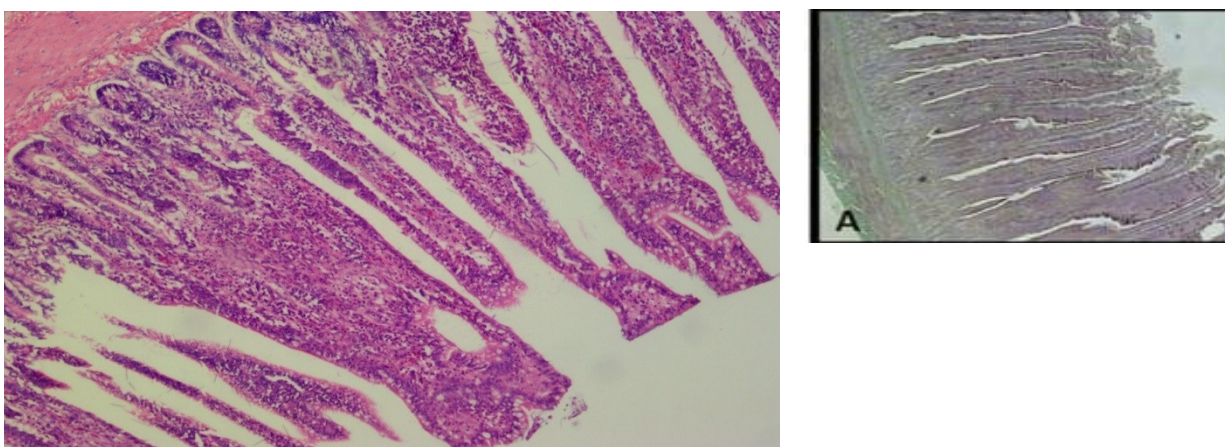


Figura 22. H y E, duodeno 40X. Nótese la severa atrofia y fusión de vellosidades e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario difuso severo en la lámina propia. A- Corte normal

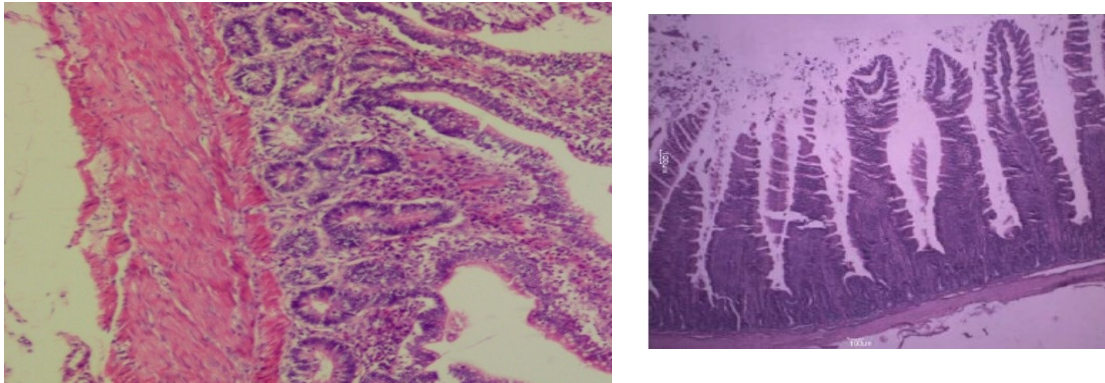


Figura 23. Atrofia y fusión. Infiltrado linfoplasmocitario severo y difuso en lámina propia (Enteritis linfoplasmocitaria).

Los hallazgos demuestran que los mayores problemas de histopatológicos se presentan en la aves suplementadas con las bacterias lácticas (tabla 20 y figuras 21 a 24). Al parecer la administración del probiótico tuvo un efecto sobre la presentación de estas lesiones.

Al respecto Castro-Gonzales et al. (2019) mencionan que la investigación sobre los problemas que pueden causar los probióticos en condiciones inadecuadas o bajo pacientes inmunodeprimidos es reciente y los resultados apunta a la verificación del tipo de cepa que se utiliza, la resistencia a los antibióticos y problemas en la mucosa gástrica; con respecto a este último problema, los estudios apuntan a que la bacteria láctica influye no directamente sobre la aparición de las lesiones, sino que éstas bacterias en casos poco frecuentes incrementan estas lesiones como consecuencia de una elevado crecimiento de la bacteria.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los resultados recién están en evaluación y estos apenas son preliminares, lo que aún no genera el desarrollo de respuestas concluyentes. Con referencia a lo anterior, las atrofas observadas pueden ser causadas por alguno de estos tipos de problemas, ya que a nivel local no se ha probado la dosis necesaria y efectiva de suministro de probióticos en las condiciones que presentó el estudio.

Tabla 20. Porcentaje de lesiones encontradas en los diferentes segmentos del intestino delgado.

T0			T1			T2			T3		
D	Y	I	D	Y	I	D	Y	I	D	Y	I
0,00	0,00	66,67	16,67	50,00	16,67	16,67	83,33	83,33	100,00	100,00	100,00

I: ileon, D: duodeno, Y: yeyuno

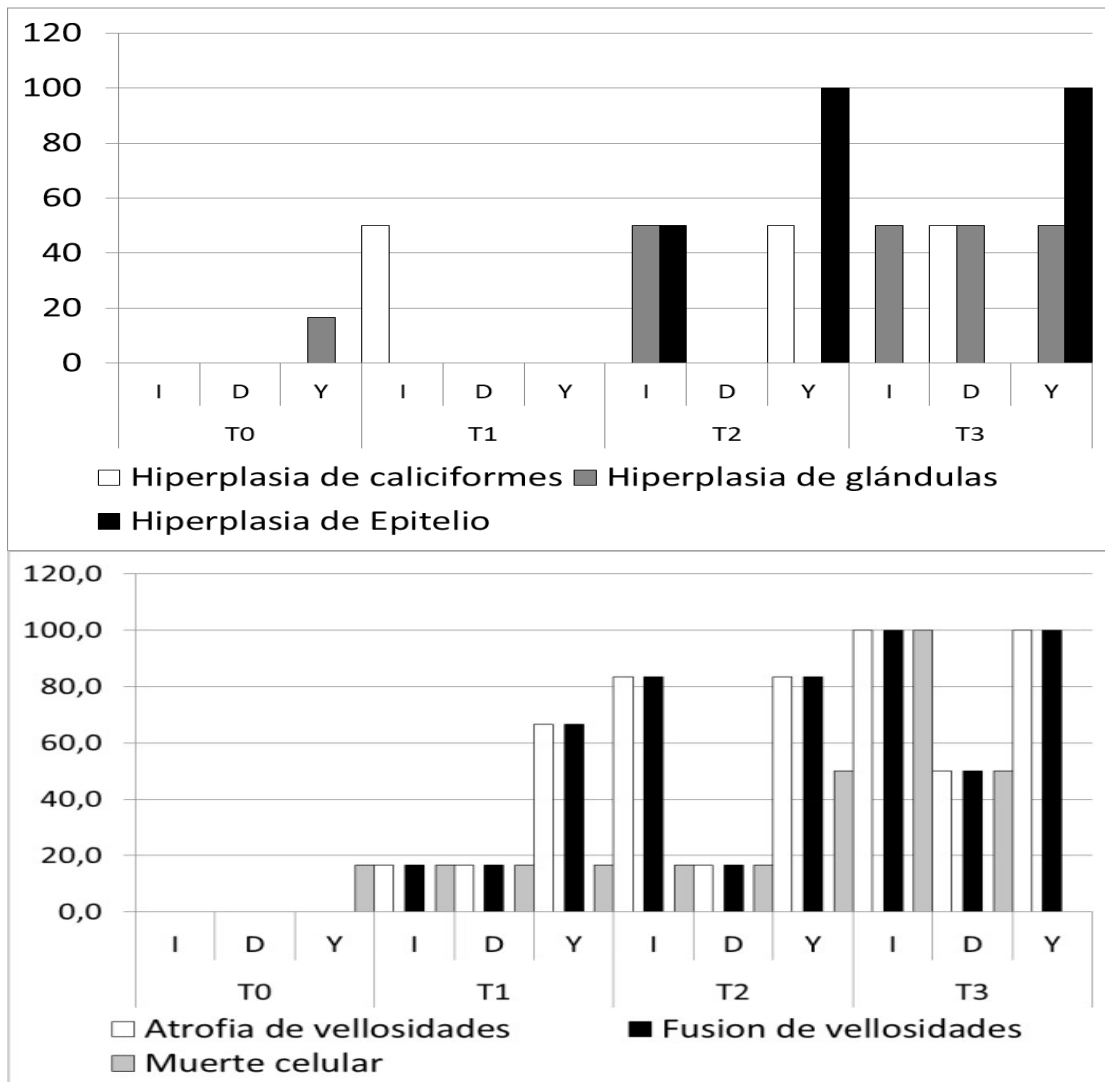


Figura 24. Hallazgos histológicos en los tratamientos evaluados.

De igual manera, las lesiones encontradas en los tratamientos hacen evidente que hay una asociación entre el suministro del probiótico y los cambios encontrados en el epitelio intestinal.

Probablemente la Lactoacidosis y producción de metabolitos de estos microorganismos ocasionaron cambios en el microambiente intestinal que originaron muerte celular. Los hallazgos son concordantes con lo encontrado por Mesias y Orbes (2016), que trabajaron con el suministro a cuyes de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*, durante 45 días.

También resultados parecidos se encontraron con el estudio realizado por Cortes et al. (2000) en donde se suministró a pollos broilers, *Bacillus toyoi* en diferentes concentraciones y se encontró que en las aves sometidas a tratamientos hasta los 49 días de edad tenían lesiones como: atrofia de vellosidades, hiperplasia linfoide, infiltración linfocitaria, infiltración de heterófilos y fusión de vellosidades en intestino delgado y tonsilas cecales.

7.6.6 Inmunohistoquímica.

Las láminas de la prueba de inmunohistoquímica se pueden observar en la figura 25 y su marcación en la figura 26.

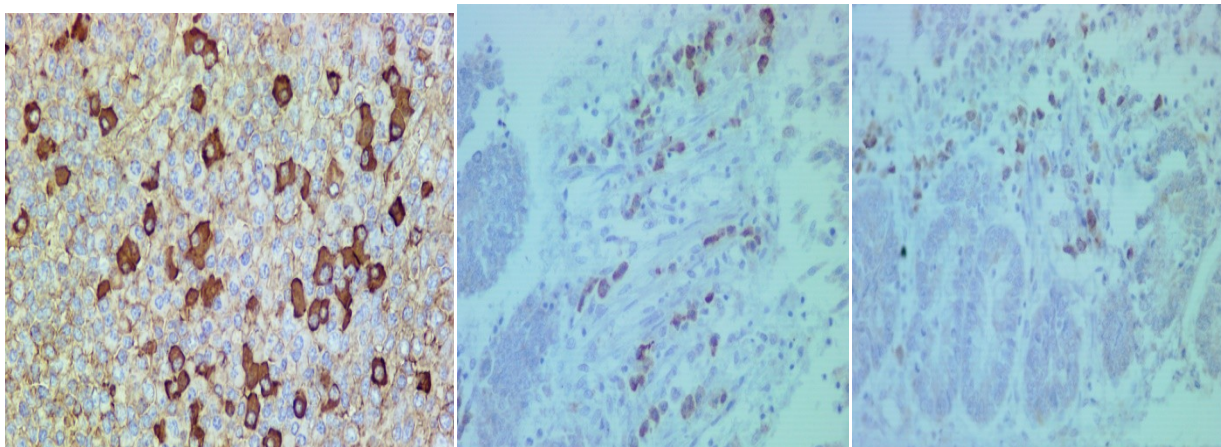




Figura 25. Láminas de inmunohistoquímica.

Figura 26. Láminas de inmunohistoquímica: A- Control positivo. B y C- Láminas de las aves estudiadas.

Los resultados demuestran que es factible utilizar inmunohistoquímica para humanos en la marcación de tejidos gastrointestinales del pollo de engorde. Esto puede abrir nuevas posibilidades para la investigación en especies con fines de producción animal.

A **Tabla 21. Recuento de Linfocitos B de pollos de 35 días.** **B** **por productores de IgA** **C** **inmunohistoquímica en intestino delgado**

Trat	Conteo en 10 campos
T0	367
T2	226
T3	27
T4	143.5

T0: testigo; T2: probiótico comercial; T3: *L. casei* microencapsulado; T4: *L. casei* sin microencapsular.

En los recuentos de linfocitos B que están expresando proteínas para IgA, se encontró que el tratamiento T0 (testigo) tiene mayor cantidad de estas células, mientras que por el contrario el tratamiento que recibió el microencapsulado (T3) expresó la menor cantidad. Este hallazgo es muy importante, ya que demuestra que *L. casei* realiza inmunomodulación en el tejido intestinal de aves, contrario a lo reportado por la mayoría de autores (Dargahi et al. 2018; Lee et al. 2018; Keseleva & Novick 2013), quienes atribuyen a los BAL un aumento de la inmunidad humoral local en intestino delgado. Lo anterior permitiría explorar que por alguna razón la inmunidad en mucosas es mayor en el grupo sin tratamiento.

De igual manera, Keseleva & Novick (2012) y Macpherson & Harris (2004) indican que la respuesta inmunitaria adaptativa se ve influenciada por los macrófagos y células epiteliales que se

encuentran estimuladas por la presencia de probióticos que estimula las células T reguladoras; además las citoquinas IL-10 tolerantes de TGF β , IL-10 que conducen a la supresión de la secreción de IgA y al efector T helper(Th) -1, Th2, Th17 y respuestas de células T (Tc) citotóxicas.

Por otra parte, Sato et al. (2009) encontraron estimulación de linfocitos T por la administración de probióticos, a través de los receptores Toll, que contribuyen a la presencia de antígenos. Sin embargo, para los linfocitos B no se observó estimulación. Esto resultados apoyan la respuesta observada en el intestino delgado de los pollos. Sin embargo, Torii et al. (2007) menciona que el suministro de bacterias lácticas (*L. acidophilus* L-92) suprime respuestas alérgicas en un modelo de antígeno en ratones, lo que reduce la secreción de IFN-gamma, IL-4 e IL-10 y aumenta de manera significativa los niveles de IgA, TGF-beta y células Treg (T).

Todo esto demuestra que los probióticos promueven la inmunidad adaptativa de manera tal que los antígenos IgG y IgA se producen como respuesta al consumo de probióticos (Delcenseri et al. 2008; Michalkiewicz et al. 2003).

7.6.7 Recuento de células caliciformes.

Se puede observar las láminas de células caliciformes en figura 27 y su marcación en la figura 28.

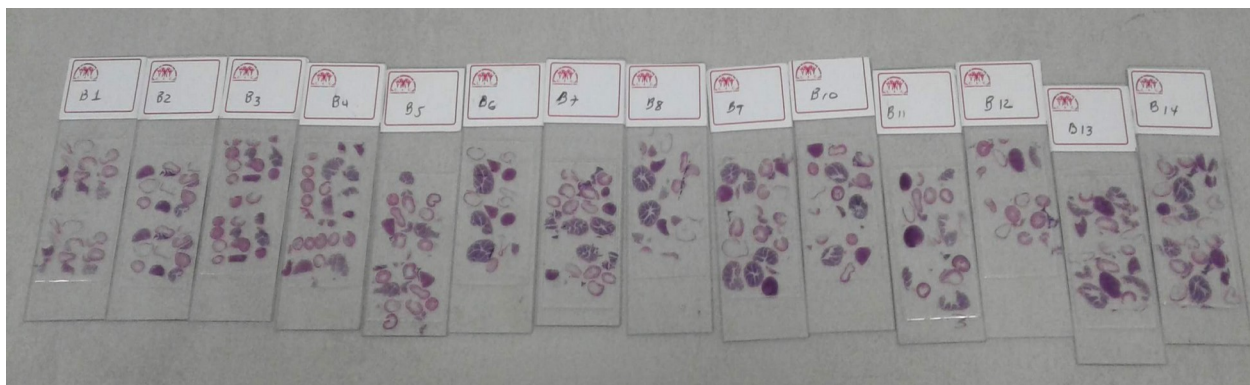


Figura 27. Laminas Alcian blue para recuento de células caliciformes.

Los resultados demostraron que se realizó una marcación del número de células caliciformes

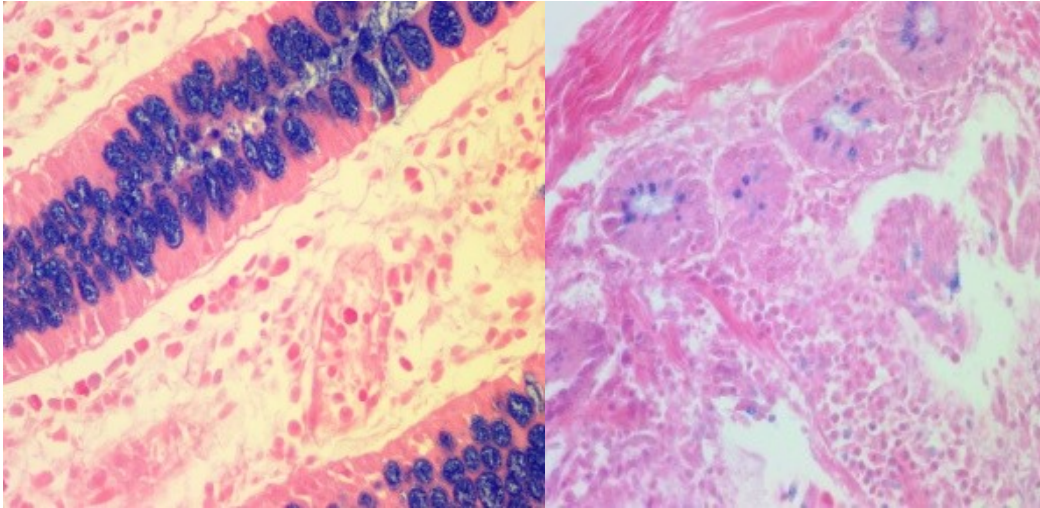


Figura 28. Marcación de células caliciformes. Derecha control. Izquierda tejido de las aves estudiadas.

La marcación de células caliciformes con alcian blue fue efectiva en aves, lo que demuestra que la técnica también puede ser utilizada en este tipo de tejido. En la fotografía se puede apreciar que la marcación a pesar de no ser tan fuerte como en el testigo, si se reconoce las zonas marcadas. Al respecto Campos et al. (2012) mencionan que las células caliciformes se encargan de secretar moco y se encuentran tanto en las vellosidades como en las criptas. Su importancia radica en que presentan variaciones de acuerdo con factores ambientales y clínicos, lo que permite identificar determinadas patologías.

Los estudios realizado por Aliakbapour et al. (2012) y Caballero-Franco et al. (2007) demostraron que el suministro de probióticos contribuye a mantener la integridad de la mucosa intestinal. Las bacterias probióticos actúan como filtro de moléculas y sustancias nocivas hacia el intestino, lo que evita que este tipo de agentes realicen daño en la mucosa del huésped.

En este estudio se encontró que el T0, T3 y T4 mostraron marcación similar para producción de mucina acida mientras que el tratamiento con el probiótico comercial presento recuentos más bajos.

Se esperaría que por las lesiones encontradas en la histopatología los tratamientos T3 y T4 fueran los que más estén expresando secreción de mucina, como respuesta a la inflamación del tejido; sin embargo vemos que T0 tiene un numero un poco mayor de producción de mucina acida.

Tabla 22. Recuento de células caliciformes

Trat	Conteo en 10 campos
T0	1476
T2	957
T3	1434
T4	1385

T0: testigo; T2: probiótico comercial; T3: *L. casei* microencapsulado; T4: *L. casei* sin microencapsular.

Los tratamientos a los que se les suministró *L. casei* muestran una mayor producción de mucina en comparación con el probiótico comercial. La producción de mucina ácida presenta un interrogante importante, ya que en el grupo control se encontró un número similar de células caliciformes y esto posiblemente sea el resultado de una gran variabilidad en las poblaciones celulares, inclusive dentro del mismo segmento intestinal. Otra razón puede ser que el grupo control tuviera patologías subyacentes o subclínicas que estuvieran generando esa mayor producción de mucina. Sin embargo, con los análisis realizados no se puede dilucidar claramente estos resultados. Para evitar lo anterior se debería trabajar en aves completamente aisladas y que provengan de laboratorios que garanticen animales libres de patógenos (SPF).

Conclusiones

Lactobacillus casei demostró un crecimiento adecuado en condiciones gastrointestinales *in vitro*, lo que confirma su potencial probiótico.

La microencapsulación de *L. casei* por la técnica de spray drying (secado por aspersion), utilizando inulina y maltodextrina, mostró características de viabilidad, eficiencia y condiciones físicas que permiten concluir que es una técnica adecuada y que con esta se logra una mejor colonización del tracto gastrointestinal.

Se logró verificar por microscopia electrónica, la efectiva implantación del *L. casei* en el intestino delgado en los grupos de animales a los que se les suministro esta BAL.

Se debe evaluar dosis y frecuencia de administración de los probióticos a base de bacterias ácido lácticas para mejorar efectos en morfología intestinal.

A pesar de que el experimento no se realizó con condiciones adecuadas como en los sistemas de producción comercial y debido a las condiciones particulares del estudio, el efecto del suministro de *L. casei* fue positivo en los parámetros productivos.

La inmunomarcación demostró que el tejido gastrointestinal del pollo de engorde responde de manera positiva a la inmunohistoquímica para IgA usada en humanos.

La coloración de alcian blue permite identificar y contar las células secretoras de mucina acida en aves de engorde.

Es necesario clarificar el efecto de *L. casei* respecto a la producción de IgA y el estímulo sobre mediadores inflamatorios e inmunológicos.

El suministro de *L. casei*, tiene efecto sobre la persistencia de anticuerpos postvacunales.

L. casei tiene mejor efecto sobre la producción de mucina acida en el intestino delgado de pollos de engorde comparado con el probiótico comercial usado en este estudio.

Se verifico el efecto de exclusión competitiva que realiza *L casei* sobre las poblaciones de coliformes en intestino delgado de las aves en estudio.

Recomendaciones

Se debe continuar con la evaluación de otros materiales microencapsulantes,

De igual manera, se debe evaluar otras técnicas de microencapsulación diferentes a spray drying como la ventana refractiva.

Se debe ajustar la cantidad de inóculo suministrado y la frecuencia de administración en aves de engorde, para ver si existen cambios significativos en la viabilidad del microencapsulado y su colonización en el tracto digestivo.

Realizar diferenciación en los tipos de colesterol, al igual que medir el cortisol con el fin de evaluar las condiciones de estrés de los animales.

Trabajar con cepas autóctonas y en consorcio para determinar los efectos sobre el organismo huésped en estimulación del sistema inmune.

Evaluar otras cepas diferentes de *L.casei* en las diferentes fases de producción aviar (reproductoras, ponedoras)

Continuar con la investigación en los marcadores de inmunohistoquímica para ver su efectividad en la identificación de células del tracto digestivo de aves.

Estudiar órganos linfoides de aves sometidas a tratamiento con probióticos, para conocer más acerca de la respuesta inmune.

Identificar otros marcadores inmunológicos con el fin de completar la información sobre la respuestas inmune.

Realizar otros ensayos de la exclusión competitiva que hace *L. casei* con microorganismos patógenos.

Referencias Bibliográficas

- Aguilera-Díaz, M. M. (2014). Determinantes del desarrollo en la avicultura en Colombia: instituciones, organizaciones y tecnología. *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional y Urbana; No. 214*.
- Aguirre et Al. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures .*Bioresource Technology* 101 (2010) 2837–2844. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.047
- Aliakbarpour, H. R., Chamani, M., Rahimi, G., Sadeghi, A. A., & Qujeq, D. (2012). The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(9), 1285.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.
- Avila, J; Ávila, M; Tovar, B; Brizuela, M; Perazzo, y; Hernández, H; Capacidad probiótica de cepas del genero *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista científica*. 2010.
- Arenas J (2014). Determinación de algunos parámetros zootécnicos en pollos de engorde de la línea Ross x Ross, suplementados con un consorcio de microorganismos probióticos (Tesis de pregrado). Corporación Universitaria Lasallista .Caldas – Antioquia.
- B. Cancho Grande, M. S. García Falcón & J. Simal Gándara. El Uso De Los Antibióticos En La Alimentación Animal: Perspectiva Actual The Use Of Antibiotics In Animal Feeds: An Actual Perspective O Uso Dos Antibióticos Na Alimentación Animal: Perspectiva Actual, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2000, 3:1, 39-47. DOI: 10.1080/11358120009487647.

Barrera, P. Probióticos, Conciencia Animal, Bogotá-Colombia.2008.5p.

.Consultado,junio.20/2107:<http://www.concienciaanimal.cl/paginas/temas/temas.php?d=976>.

Batt, R. M.; H. C. Rutger y A. A. Sancak. Enteric bacteria: friend or foe? J. Small Anim. Pract. 1996. 37 (6):261 - 267.

Beauchamp, T. y Childress, J. Principles of Biomedical Ethics... 5 Ed. New York: Oxford University Press Inc. 2001.

Bergey, R. Manual of determinative bacteriology. 7 Ed, 1957:1094.

Blajman, J.E.; Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.; Astesana, D.M.; Fusari, M.L.; Soto,L.P.; Rosmini, M.R. y Signorini, M.L..Probiotics and broiler growth performance: a meta-analysis of randomized controlled trials. Br. Poult. Sci.2014.55:483 - 494.

Blanch, A.Probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición y salud animal.nutriNews Junio-Julio 2015.

Bogovic-Matijasic B, Rogelj I. *Lactobacillus* K7-a new candidate for a probiotic strain. Food Technol. Biotechnol.2000.38: 113-119.

Brooker, B. and Fuller, R. Adhesion of Lactobacilí to the chicken crop epithelium. Journal of Ultrastructure Research, 1975 52:21-31.

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). The VSL# 3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G315-G322.

Caja, G., Gonzales, E., Flores, C., Carro, D. Y Albanell, E. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes. Universidad Autónoma de Barcelona y Universidad de León. Barcelona. 2003.

Calzadilla F, Pérez M, Piad R. Influencia de un prebiótico a base de hidrolizado de Levadura en la ecología microbiana de aves. *Revista Avanzada Científica*. 2006.9 (1):1-7.

Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut pathogens*, 9(1), 12.

Castro L & De Rovetto C (2006). Probióticos: utilidad clínica *Colombia Médica* (37) 4.

Castro González, J. M., Castro, P., Sandoval, H., & Castro-Sandoval, D. (2019). Probiotic lactobacilli precautions. *Frontiers in microbiology*, 10, 375.

Castro M, Rodríguez F. Levaduras: probiótico y prebiótico que mejoran la producción animal. *Rev Corpoica*. 2005.6(9):26-38.

Castro, L., Méndez, M., Gómez, G., & Pedrozo, R. (2018). REFERENCE INTERVAL OF BLOOD BIOCHEMICAL VARIABLES IN RUSTIPOLLOS RAISED UNDER CONDITIONS OF SUBTROPICAL-HUMID CLIMATE. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 8(2), 13-19.

Chambers, J.R. and Gong, J. The intestinal microbiota and its modulation for salmonella control in chickens. *Food Res Int*, 2011.44:3149-3159.

Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35.

Charteris W et al (1998).Desarrollo y aplicación de una metodología in vitro para determinar la tolerancia al tránsito de especies potencialmente probióticas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en el tracto gastrointestinal superior humano. *Journal of Applied Microbiology* 84, 759-768

Chávez, L. et Al .Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos de zootecnia*. 2016.65 (249): 51-58.

Chen, M.; Stern, N.J.; Bailey, J.S. y Cox, N.A.Administering mucosal competitive exclusion flora for control of salmonellae. *J. Appl. Poult. Res.* 7: 384chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 1998.20:7-12.

Clifford, A. Avicultura y ácidos en la dieta. *Rev. Alimentos Balanceados para Animales*. Marzo/Abril.2000:14 - 16.

Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8 ed. Washington D.C.: National Academies Press, 2011. : 1-2. ISBN: 0-309-15401-4

Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 245-256.

Corrier, D.E.; Hinton, A.; Ziprin, R.L.; Beier R.C. y DeLoach, J.R...Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella* tiphymurium colonization of broiler chicks. *Avian Dis*.1990.34: 617 - 625.

Cortes A et Al. El efecto del *Bacillus toyoi* sobre el comportamiento productivo en pollos de engorda. *Vet. Méx.* 2000.31 (4):301-308.

Crueger, W. y Crueger, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, p.118. ISBN: 8420007439, 9788420007434.

Curi K et al (2014).Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei* Evaluation of acid whey fermentation (whole and deproteinized) using *Lactobacillus casei* Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVI No. 1 Julio 2014 137-145

Davidson, J. N. y Hirsch, D. C. Bacterial competition as a means of preventing diarrhea in pigs. *Infect Immun.* 1990.13:1773-1774.

Darjani, P., Nezhad, M. H., Kadkhodae, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162-167.

Dargahi, N., Johnson, J., Donkor, O., Vasiljevic, T., & Apostolopoulos, V. (2019). Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases?. *Maturitas*. Voll 119, 25-38

Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., & Roy, D. (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current issues in molecular biology*, 10(1/2), 37.

De Ross, N.M. & KATAN, M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American J. Clinical Nutr.* 1990.71:405

de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.

De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 27-39.

Di Battista, Carla Agustina. Microencapsulación de Fitoesteroles Mediante Secado por Atomización. Tesis de Doctor en Ingeniería Química. Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur, 2016. 97 p.

Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Petrović, T., Dimitrijević-Branković, S., Lević, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2016). Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 169-174.

Eckert, N.H.; Lee, J.T.; Hyatt, D. et al. Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets. *J. Appl. Poult. Res.* 2010.19:59-67.

Elwinger, K., Fisher, C., Jeroch, H., Sauveur, B., Tiller, H., & Whitehead, C. C. (2016). A brief history of poultry nutrition over the last hundred years. *World's Poultry Science Journal*, 72(4), 701-720.

Estrada M y Col. UN probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica*

- serovariedad enteritidis Durante la crianza de aves ligeras. Vet. Méx .2010.vol.41 no.1 México ENE. /mar.
- Etleva, V.; Thanas, P.; Pashk, L. y Myqerem, T. Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. *Livestock Science*, 2010.134:249-251.
- Fang Yan and D. Brent Polk.Probiotic Bacterium Prevents Cytokine-induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells, *The journal of biological chemistry*, Published, JBC Papers in Press, October 21.2002.277(52):50959–50965., DOI 10.1074/jbc.M207050200.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44-61.
- Fooks L, Gibson G. Probiotics as modulators of the gut flora. *British J. Nutr.* 2002.88(1):S39-S49. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN2002628>.
- Forte C.Effects of two different probiotics on microflora, morphology, and morphometry of gut in organic laying hens.*Poultry Science* 2016.95:2528–2535
- Freitas, M.; Tavan, E.; Cayuela, C. y cols. Host-pathogens crosstalk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell*, 2003. 95:503-506.
- Fuller R.Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* .1989.66:365-378.
- Fuller, A. and Brooker, 6. Lactobacilil which attach lo Te crop epithelium of the fowl. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1974.27:1305-1311.
- Fuller, A. and Brooker, 6. Tite attachment of bacteria to the squamous epithelial celí and its importance in the microecology of the intestine. In *Microbial Adhesion FO Surfaces*. Ed.

- fi. Berkeley, J. Lynch, J. Melling, P. Rutter, and 6. Vincent, Ellis Horwood Ltd. Chichester, 1980:495- 507.
- Fuller, Fi. And Turvey, A. Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl. *Journal of Applied Bacteriology*, 1971.34:617-622.
- Fuller, H. Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. *Journal of Applied Bacteriology*, 1973.36:131-139.
- Gaggia, F.; Mattarelli, P. and Biavati, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol*, 2002. 141 Suppl: S15
- Gambos, S. Lacto-sacc supplementation of diets fed growing pigs: Effects of various. 1991.
- Gandhi, A., & Shah, N. P. (2016). Effect of salt stress on morphology and membrane composition of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium bifidum*, and their adhesion to human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *Journal of dairy science*, 99(4), 2594-2605.
- García C et al (2013) Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* .11 (1):136 – 143.
- García Y et al (2005) Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 39, No. 2, 2005. 129
- García, Y., & López, A., & Boucourt, R., & Elías, A., & Dihigo, L. (2002). Efecto del tratamiento térmico en un hidrolizado enzimático de crema de levadura *Saccharomyces*

cerevisiae en los niveles de colesterol en pollos de ceba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36 (4), 361-365.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the procaryotes *Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd edn, vol. 5. Edited by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, & W. B. Whitman.* New York: Springer.

Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, X., ... & Zhang, H. (2017). Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 5(1), 91

Germán, A. J.; Hall, E. & Day, M. Immune cell population with in the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2001.15:14-25.

Ghadban, G. Investigation on the efficacy of early probiotic treatment on the performance of broiler chicks. *Proceedings of 10th European Poultry Conference, June 21-26, Jerusalem, Israel. 1998.2: 305 - 310.*

Ghadban, G.S. Probiotics in broiler production - a review. *Arch. Geflügelk.* 66.2002: 49 - 58.

Ghadban, G. Studying on productivity of chickens broilers treated by biological products. Ph.D. thesis, Thracian University, Stara Zagora, Bulgaria. 1999

Giannenas, I.; Papadopoulou, E.; Tsalie, E.; Triantafillou, E.; Henikl, S.; Teichmann, K. and Tontis, D. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol*, 2012.188: 31-40.

- Girard, M., Turgeon, S. L., & Gauthier, S. F. (2003). Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin–pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4450–4455.
- Gonzales, B. E., Gomez, M., & Jimenez, S. (Abril-Junio de 2003). Bacterocinas de probióticos. *Revista de salud publica y nutrición.*, 4(2), 1-7.
- González Cuello, R. E., Pérez Mendoza, J., & Morón Alcázar, L. B. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información tecnológica*, 26(5), 11-16.
- Gordon G & Doelle H, (1976) Purification, Properties and Immunological Relationship of L(+)-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. *Eur. J. Biochem.* 67, 543 – 555.
- Grimes, J.L.; Rahimi, S.; Oviedo, E.; Sheldon, B.W. y Santos, F.B.O. Effects of a direct-fed microbial (Primalac) on turkey poult performance and susceptibility to oral Salmonella challenge. *Poult. Sci.* 2008.87:1464 - 1470.
- Guerrero Florez, Gladys Milena; Guzmán Salazar, Sandra Sofía y Yandar Barahona, Nubia Yadira. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus* aislado de tracto intestinal humano sobre *Vibrio cholerae* 01 OGAWA in vitro (2002).
- Gunther, K. Taxonomy, ecology and resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International J. Food Microbiology*, 2003.88:123.
- Gunther, K. The role of probiotics as feed additives in animal nutrition. Department of animal physiology and animal nutrition. Göttingen, Germany. 1995.
- Gupta V. y Garg, R. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009.27(3):202-209.

Gusils, C.; González, S. N.; Oliver, G. Some probiotic properties of chicken's lactobacilli. Canadian Journal of Microbiology. 1999. 45 (12): 981-987.

Gutierrez L et al (2013) Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Producción más Limpia .Enero - Junio de 2013. Vol.8, No.1 - 135•146

Gutiérrez L et Al. Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus Casei* en queso crema. Red Revista Lasallista de Investigación, 2009. 4(2):41.

Havenaar R. Y Huis in 't Veld. In the Lactic Acid Bacteria: Vol. 1. The Lactic Acid Bacteria in Health and disease (Wood B. J. b. ed.) pp. 151-170 Helicobacter pylori by *Lactobacillus casei* strain Shirota. Appl Environ Microbio, 1992. 70:518-526.

Hilmi, H. T. A., Surakka, A., Apajalahti, J., & Saris, P. E. (2007). Identification of the most abundant Lactobacillus species in the crop of 1-and 5-week-old broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(24), 7867-7873.

Hill, C. *et al.* Nat. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. 11:506–514; doi:10.1038/nrgastro.2014.66.

Hoyos, G; Cruz, C. Mecanismos de acción propuestos de los probióticos en cerdos. En: Biotecnología en la industria de alimentación animal. Aplingén, S.A. de C.V. 1990.

<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew164>.

<https://www.quiminet.com/articulos/farmacos-para-premezclas-veterinarias-o-medicamentosas-14818.htm>. Fecha: 31-Ago-2006 Fuente: QuimiNet .Chanco Grande et al <http://dx.doi.org/10.1080/11358120009487647>

- Humphrey T Public health aspects of Salmonella enterica in food production; Capitulo 4. Section 4.7: Contamination of poultry meat with S. Enterica. 2006:pp. 98-100.
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol.2007.117: 237-257.
- Huyghebaert, G.; Ducatelle, R. and Van Immerseel, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. Vet J.2011.187:182-188.
- Ilango, S., Pandey, R. & Antony, U. J Food Sci Technol (2016) 53: 977.
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2169-5>
- Jesica E. Blajmana et ALProbióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. Poultry Science.2007.86:2509–2516 doi:10.3382/ps.200700136.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002>
- Jiang X et AL. A phase trial of the oral *Lactobacillus casei* vaccine polarizes Th2 cell immunity against transmissible gastroenteritis coronavirus infection .Appl Microbiol Biotechnol (2016) 100:7457–7469 DOI 10.1007/s00253-016-7424-9
- Jimenez-Pranteda M.L.,Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos.Memoria para opr al grado de doctor.Universidad de Granada. 2010.
- Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N. y Jalaludin, S.Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *lactobacillus* cultures. Poult. Sci. 2000.79: 886 - 891.
- Jurado Gámez, Henry Armando. Evaluación de bacterias acido lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de

antibióticos. Trabajo de grado presentado para optar al título de Doctor en Ingeniería de Alimentos. Universidad del valle. Santiago de Cali. 2010.

Jurado H., Calpa F. y Chaspuengal A. Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia [online]. 2014. vol. 61, no. 3 [citado 2015-07-20], pp. 241-257. Disponible en Internet: <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remezvez/article/view/46872>> ISSN: 2357-3813.

Kabir, S.M.L.; Rahman, M.M.; Rahman, M.B.; Rahman, M.M. y Ahmed, S.U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. Int. J. Poult. Sci. 2004.3: 361 - 364.

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3(2), 39-48.

Kalantzopoulos, G... Fermented Products with probiotic Qualities. *Anaerobe*. 1997 (3): 185 - 190.

Kalmar, I.D.; Vanrompay, D. and Janssens, G.P.J. Broiler ascites syndrome: collateral damage from efficient feed to meat conversion. *Vet J*, 2013.197: 169-174.

Kawai, Y., Saitoh, B., Takahashi, O., Kitazawa, H., Saito, T., Nakajima, H., Itoh, T. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii* SBT2055. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2000.64:2201-2208.

- Khana S et al (2011). Assessing the effect of administering different probiotics in drinking water supplement on broiler performance, blood biochemistry and immune response. *Journal of Applied Animal Research*, Vol. 39, No. 4, December 2011, 418428
- Kiseleva, E., & Novik, G. (2013). Probiotics as immunomodulators: substances, mechanisms and therapeutic benefits.
- Koopman, J., Stadhouders, A., Kennis, H. And Boer, H. The attachment of filamentous segmented microorganisms to the distal ileum wall of the mouse: a scanning and transmission electron microscopy study. *Laboratory Animals*, 1987.21: 48-52.
- Korver, D.R. Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Anim Feed Sci Technol*, 2012.173: 54-64.
- Král, M.; Angelovicová, M. and Mrázová, L. Application of probiotics in poultry production. *Anim Sci Biotechnol*, 2012.45: 55-58.
- Kumar, M. et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr. Rev.* 2013.71: 23–34.
- Laurencio, M.; Pérez, M.; Piad, R.; Milián, G.; Rondón, A. J.; Díaz, M. Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva en indicadores microbiológicos en pollos de ceba. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2005.5(1): 48-53.
- Lee, A. Neglected niches. The microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Advanced Microbiology and Ecology*, 1995.8:115.
- Llorente F, Y Dalmau S.J. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Española*.2001.59:150-155.

- Lodemann, U. Effects of probiotics on intestinal transport and epithelial barrier function. In: R.R. Watson and V. Preedy (Eds). Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics. 1st Ed. 2010:303-333.
- Londero, A. Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. 2012.
- López N, Afanador G, Ariza C. Evaluación de tres levaduras provenientes de ecosistemas colombianos en la alimentación de pollos de engorde. Rev Corpoica. 2009.10 (1): 102-114.
- Loulouda A. Bosnea & Thomas Moschakis & Costas G. Biliaderis Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses. Food Bioprocess Technol (2014) 7:2767-2781 DOI 10.1007/s11947-014-1317-7
- Lyons, P. Opinión de los hombres de negocio. Avicultura Profesional. 1997.15 (7): 22.
- Mack, D. R.; Michail, S.; Wei, S.; McDougal, L. & Hollingsworth, M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am J Physiol, 1999.39:941-950?
- Majhenic, A.C., Venema, K., Allison, G.E., Matijasic, B.B., Rogelj, I., Klaenhammer, T.R. Dna analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004; 63:705-714.

- Maldonado C & Perdigo N (2006).The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity Clinical and Vaccine Immunology, 2006, 13(2): 219–226.
- Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 478.
- Mantilla C y Burgos A. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV No. 1 Julio 2012:31-40
- Marteau P, M. V. (2001). Protection from gastrointestinal diseases. *Am J Clin Nut* (73 (suppl)), 430-436.
- Martinez G (2010).Probióticos, prebióticos y simbióticos y su uso en la producción animal:tesis de pregrado.Universidad Autonoma Agraria.Torreón, Mexico.
- Marteau, P; Minekus, M; Havenaar, R In't Veld. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine. Citado por Ibíd., p. 29, (Traducido por los autores).
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- Medina *et al.* Desempeño productivo de pollos de engorde suplementados con biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada de la fermentación de residuos de banano. Rev Fac Med Vet Zoot. 61(3), septiembre – diciembre 2014: 270-283.
<http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v61n3.46873>.

Mesias-Pantoja, N y Orbes-Villacorte, A. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Trabajo de grado presentado para optar al título de Zootecnista. Universidad de Nariño. Pasto.2016.

Michalkiewicz, J., Krotkiewski, M., Gackowska, L., Wyszomirska-Gołda, M., Helmin-Basa, A., Dzierżanowska, D., & Madaliński, K. (2003). Immunomodulatory effects of lactic acid bacteria on human peripheral blood mononuclear cells. *Microbial ecology in health and disease*, 15(4), 185-192.

Milbradt, E.L.; Okamoto, A.S.; Rodrigues, J.C.Z.; Garcia, E.A.; Sanfelice, C.; Centenaro, L.P. y Andreatti Filho, R.L. Use of organic acids and competitive exclusion product as an alternative to antibiotic as a growth promoter in the raising of commercial turkeys. *Poult. Sci.* 2014.93: 1855 - 1861.

Milian, G. Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 42, n° 2 (2008).

. Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las Lajas, La Habana, 2005. 16p.
Consultado en: // www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/

Moreno, E. Probióticos y aves, *Veterinaria Profesional*, Islas Canarias España.1999. 5 p.
Consultado en: <http://www.timbrado.com/artprobioticos.shtml>.

- Morishita, K., Mitsuoka, M., Kaneuchi, S., Yamamoto, Y. and Ogata, Nature, 241.K...Specific establishment of Lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. *Japan Journal of Microbiology*, 1971.15: 531-538.
- Moschakis, T., Murray, B. S., & Biliaderis, C.G. (2010). Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 8–17.
- Nemeskery, T. Probiotics for Young animals. *Feed Int.* Dec. 1983:46.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145-1158.
- Nimruzi, R. Whey as a source of probiotics. *World Poultry-Elsevier*. 1999.15 (10): 37.
- Nurmi, E. & Randala, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. 2010
- Ochi, Y., Mitsuoka, T. And Segal, T. Studies on the intestinal flora of chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 1964.20: 7-12.
- Oliver, G., Leche biótica. *Rev. Nueva*. 279.1996:14 - 18.
- Osorio C y col. Comparación del rendimiento productivo de pollos de carne suplementados con un probiótico versus un antibiótico. *Rev inv vet Perú*. 2010. (2): 219-222.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1-4), 279-289.

- PAEZ, Beatriz. Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para la aplicación en alimentos. Tesis de grado para obtener el título de Doctor en ciencias exactas. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. p. 145 2013
- Palamidi et Al. Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. Poultry Science 2016.95:1598–1608
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew052>
- Parra Huertas, R. A. (Enero-Junio de 2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de ciencias agropecuarias, 8(1).
- Perdigón G & Holgado APR. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: Fuller R, Perdigón, and G. Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Dordrecht: Kluwer Academic 2000: 213-233.
- Pivnick, H. y Nurmi, E. The Nurmi Concept and its role in the control of Salmonella in poultry. En: Developments in food microbiology 1. (Eds.: Davies, R.). Applied Science Publishers, London, 1982, p. 41 - 70.
- Plaza, J.; Gomez, C.; Fontana, L. and Gil, A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. World J Gastroenterol, 2014.20: 15632-15649.
- Pollmand, D.C. Probiotics in pig diets. In: W. Haresing and D.J.A Cole (Eds.). Recent Advances in Animal Nutrition. London: Butterworths. 1986, p 193-205.

- Premi, L. Seminario internazionale su IL terapeutico Del lattobacilli. Roma. Protein and energy sources. Biotechnology in the feed industry. Proceeding of ALLTECHS Seventh Annual Symposium. Edit. By T.P Lyons. Nicholasville, Kentucky 40356. 1974. p 391-393.
- Putzai, A.; Grant, G.; King, T. P. & Clarke, E. M. Cheminical Probiosis. In: W. Haresing and D.J.A Cole (Eds.). Recent Advances in Animal Nutrition. London: Butterworths, 1990:47.
- Ramírez, C. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Trabajo de grado doctorado en Procesos Biotecnológicos, Curitiba: Universidad Federal do Paraná. 2005. 153 p.
- Regino K, et al. (2014). Rev. Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei* Evaluation of acid whey fermentation (whole and deproteinized) using *Lactobacillus casei* Colomb. Biotecnol. Vol. XVI No. 1 137-145
- Reid, G., Jass, J., Sebulski, M.T. y McCormick, J.K. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clinical Microbiology Reviews. 2003. 16:658-672
- República de Colombia. el Congreso de Colombia. Ley 84 DE 1989 (Diciembre 27). Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Diario oficial. Bogotá, D.C.: El congreso, 1989. No. 39120.

Republica de Colombia. Ministerio de Salud. Resolución N° 008430 de 1993 (4, octubre, 1993).

Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá, D.C.: El Ministerio, 1993. p. 11.

Ronquillo, M. G., & Hernandez, J. C. A. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255-267.

Ricardo Cepero B. (2005). Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento. XII Congreso bienal de la Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal., (págs. 1-49). Puerto Vallarta, Jal.

Rodklongtan, A.; La-ongkham, O.; Nitisinprasert, S. y Chitprasert, P. Enhancement of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate-chitosan semiinterpenetrating polymer networks. *J. Appl. Microbiol.* 2014.117: 227 - 238.

Rodríguez, V. y Guerrero, J. Probióticos, resistencia gastrointestinal y microencapsulación. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 2010.4, (2):48-57.

Rodriguez, María (1994). Bacterias productoras de ácido láctico: efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Rolfe, D.R. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 2000:130:396.

- Rosenberg, Helmar; Gonzales B., Sergio; Duarte G., Ignacio y Chuaqui, Benedicto. Capítulo 6: Patología celular. Técnicas Diagnósticas en Histopatología. En: Manual de Patología general. 2 ed. Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile, 2011.
- Ross, M. y. (2012). Técnica histológica y microscopía. En: Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. (6 ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Salazar E et al *Lactobacillus casei* strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: A randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial *BMC Pediatrics* 2004, 4:18 <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/4/18> Mi traducción.
- Salminen, S; Isolauri, E. and Salminen, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* .1996:70
- Salmonella in poultry. En: Developments in food microbiology 1. (Eds.: Davies, Salvador, F; Cruz, D. Nutracentricos. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia. México D.F.2009. 88p.
- Samaniego L et al (2007). Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva sobre indicadores productivos en pollos de ceba *Tecnología Alimentaria*.5 (5):360-367, DOI: 10.1080/11358120709487713.
- Samaniego L, et al (2000). *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Universidad de Matanzas .Cuba.

- Sánchez, J.; Esteve-García, E.; McNab, J.; Díaz, D. y Gracia, M.I. Bioefficacy of a probiotic feed additive in broiler diets. 16th European symposium on poultry nutrition. Strasbourg , Francia, 26 al 30 de Agosto de 2007, p. 619 – 622
- Sanders, M. (2000.). J. Nut. Considerations for Use of probiotic bacteria to modulate human health (130), 384S-390S.
- Sarra, P., Morelli, L. and Bottazzi, Y. The lactic microflora of fowl In the Lactic Acid Bacteria ir, Health and Disease. Ed. 8. Wood, Elsevier Applied Science, London, 1992. Pp. 4-19.
- Savage, O. Introduction to mechanisms of association of indigenous microbes. American Journal of Clinical Nutrition, 1979.32:113-118.
- Savage, O. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Ann. Rev. Microbiol, 1997.31: 107-133.
- Savage, O. The ecological digestive system and its colonisation. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 1989.8: 259-273.
- Savage, D. Adherence of the normal flora. In Attachment of organisms to the gut mucosa. Ed. E. Boedeker, CRC press, USA, 1984:3-10.
- Savage, D. Adherence of normal flora to mucosal surfaces in bacterial adherence. Ed. E.H. Beachey, Chapman & Hall, London, 1980. Pp. 33-59.
- Savage, D. Mechanisms by which indigenous microorganisms colonize gastrointestinal epithelial surfaces. Prog. Food Nutr Sc, 1983.7: 65-74.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of proteinpolysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753.

Sato, K., Takahashi, K., Tohno, M., Miura, Y., Kamada, T., Ikegami, S., & Kitazawa, H. (2009). Immunomodulation in gut-associated lymphoid tissue of neonatal chicks by immunobiotic diets. *Poultry science*, 88(12), 2532-2538.

Serrano, Paulina; María. A. Brizuela; D. E. Rodríguez; O. Almazán; G. Delgado; Lurdes Bueno; Zaida Zuaznaba; Irma Iglesia; Ibis Alvarez; D. Betancourt y D. Sánchez. Caracterización de cepas y estudio de la influencia de la fuente de carbono y su concentración para la producción de un preparado probiótico de bacterias lácticas. Resúmenes V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias: 2000:326.

Sgouras, D.; Maragkoudakis, P.; Petraki, K. y cols. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl Environ Microbio*, 2004.70:518-526.

Shu Q, Gill HS. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20 a) against *Escherichia coli* 0157: H7 infection in mice. *FEMS Immunol and Med Microbiol*, Amsterdam; 2002.34 (1): 59-64.

Simpson W J and Taguchi H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In: BJB Wood and WH Holzapfel (Eds). The genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, London, 1995:125-172.

Sinol S et al (2011) Effect of Supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 Grown on Citrus-juice Waste and Corn-soybean Meal Substrate on Growth Performance, Nutrient Retention,

- Caecal Microbiology and Small Intestinal Morphology of Broilers . Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24(8): 1120 – 1127.
- Smith, H. And Crabb, W. The faecal bacterial flora of animals and man. Its development in the young. J Pathol Bacteriol, 1961.82: 53-66.
- Smith, H. The effect of the use of antibacterial drugs, particularly as food additives, on the emergence of drug resistant strains of bacteria in animals .New Zealand Veterinary Journal/, 1967.15: 153-166.
- Spring, P. Glycomics: el rol de carbohidratos específicos como nuevos aditivos alimenticios. Swiss College of Agriculture. Revista Avicultura Profesional. 2004. 22(4): 17-19.
- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI journal of biosciences*, 24(1), 1-5.
- Stiles, M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 331-345.
- Struijk, E. A. et al. Dairy product intake in relation to glucose regulation indices and risk of type 2 diabetes. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013.23:822–828
- Tannock, G. W.; Fuller, R. y Pederson, A. Applied and Environmental Microbiology. In: P.E. Williams (Eds.) New Development in Nutrition for Growth Enhancement. *Pig. Vet. J.*, 27-91. *Tech. Off. /NT Epir*, 1990.8: 259-273.
- Timmerman, H.; Koning, C.; Mulder, L. Rombouts, F. & Beynen A. Monostrain, multistain and multispecies probiotics A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 2004.96:219- 233.

- Torii, A., Torii, S., Fujiwara, S., Tanaka, H., Inagaki, N., & Nagai, H. (2007). Lactobacillus acidophilus strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergology International*, 56(3), 293-301.
- Ushiyama, A.; Tanaka, K.; Aiba, Y. y cols. *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin resistant Helicobacter pylori infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*2003.18:986-991.
- Van Eys, J. Y Den Hartog, and L.En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.2003.
- Van Immerseel, F. et al. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, 2004.33(6):537-549.
- Vandenbergh, P. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*1993.12:221-238.
- Vargas Donoso, M. (2014). Efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre la microflora intestinal de pollos broiler. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/132108>
- Villena, M., Morales, H., Gallardo, L. y Ruiz M. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. 2009.50 (1):43-50.
- Vimala, Y. & Dileep, P. Some aspects of probiotics. *Ind. J of Microbiol.*2006.46: 1-7.
- Wang, X., Wang, Y.-W., Ruengruglikit, C., & Huang, Q. (2007). Effects of salt concentration on formation and dissociation of β - lactoglobulin/pectin complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10432–10436.

- Wang, Y. y GU, Q. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Res. Vet. Sci.* 89.2010: 163 - 167.
- Wang, G., Huang, W., Xia, Y., Xiong, Z., & Ai, L. (2019). Cholesterol-lowering potentials of *Lactobacillus* strain overexpression of bile salt hydrolase on high cholesterol diet-induced hypercholesterolemic mice. *Food & function*, 10(3), 1684-1695
- Weinbreck, F., Rollema, H. S., Tromp, R. H., & de Kruif, C. G. (2004a). Diffusivity of whey protein and gum arabic in their coacervates. *Langmuir*, 20(15), 6389–6395.
- Weinbreck, F., Tromp, R. H., & de Kruif, C. G. (2004b). Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. *Biomacromolecules*, 5(4), 1437–1445.
- Wisselink, H. J., Cornelissen, J. B. W. J., Mevius, D. J., Smits, M. A., Smidt, H., & Rebel, J. M. (2017). Antibiotics in 16-day-old broilers temporarily affect microbial and immune parameters in the gut. *Poultry science*, 96(9), 3068-3078.
- Yamawaki R. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. In embryonated chicken eggs in the prevention of Salmonella Enteritidis after hatch. *Poultry Science*.2013.92:1560–1561.
- Yang S & Andong Co (1996) Effect of Feeding Diets Containing an Antibiotic, a Probiotic, or Yucca Extract on Growth and Intestinal Urease Activity in Broiler Chicks. *J. Anim. Sci.* 24(8): 1120 – 1127 doi: 10.5713/ajas.2011.10443

Yasui, H., Kiyoshima, J. y Ushijima, H. Passive protection against Rotavirus-induced Diarrhoea of Mouse Pups Born to Nursed by Dams Fed Bifidobacterium breve YIT4046. The Journal of Infectious Diseases. 1995. 172:403- 409.

Zaninia K, . Marzottoa M, Castellazzi A, Borsari A, Dellaglio F, Torriani S. The effects of fermented milks with simple and complex probiotic mixtures on the intestinal microbiota and immune response of healthy adults and children. International Dairy Journal 2007; 17:1332-1343.

ANEXOS

Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™

- En cámara de flujo laminar tipo II, junto al mechero, y después de dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre temperatura ambiente, abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
- Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocar en la placa del cultivo principal el registro de control de calidad.
- Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el líquido hidratante.
- Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Dejar que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.
- Apretar en la parte inferior de la unidad, triturando el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
- De Inmediato, saturar bien el hisopo en el material hidratado y transferir a las cajas petri con el agar nutritivo.
- Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
- Utilizando un asa estéril, crear vetas para facilitar el aislamiento de colonias.

De Inmediato, llevar a incubar las cajas petri con el cultivo principal inoculado a 37°C por 24 horas.

ANEXO B. Análisis estadístico.

Between-Subjects Factors

		N
TRAT	T0	6
	T1	6
	T2	6
	T3	6
	T4	6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: COLES

F	df1	df2	Sig.
,656	4	25	,628

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + TRAT

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: COLES

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5821,667 ^a	4	1455,417	6,385	,001
Intercept	870403,333	1	870403,333	3818,228	,000
TRAT	5821,667	4	1455,417	6,385	,001
Error	5699,000	25	227,960		
Total	881924,000	30			
Corrected Total	11520,667	29			

a. R Squared = ,505 (Adjusted R Squared = ,426)

TRAT

Dependent Variable: COLES

TRAT	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
T0	158,667	6,164	145,972	171,361
T1	164,333	6,164	151,639	177,028

T2	161,500	6,164	148,805	174,195
T3	170,000	6,164	157,305	182,695
T4	197,167	6,164	184,472	209,861

Multiple Comparisons

Dependent Variable: COLES
Tukey HSD

(I) TRAT		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T0	T1	-5,6667	8,71703	,965	-31,2675	19,9341
	T2	-2,8333	8,71703	,997	-28,4341	22,7675
	T3	-11,3333	8,71703	,694	-36,9341	14,2675
	T4	-38,5000*	8,71703	,001	-64,1008	-12,8992
T1	T0	5,6667	8,71703	,965	-19,9341	31,2675
	T2	2,8333	8,71703	,997	-22,7675	28,4341
	T3	-5,6667	8,71703	,965	-31,2675	19,9341
	T4	-32,8333*	8,71703	,007	-58,4341	-7,2325
T2	T0	2,8333	8,71703	,997	-22,7675	28,4341
	T1	-2,8333	8,71703	,997	-28,4341	22,7675
	T3	-8,5000	8,71703	,864	-34,1008	17,1008
	T4	-35,6667*	8,71703	,003	-61,2675	-10,0659
T3	T0	11,3333	8,71703	,694	-14,2675	36,9341
	T1	5,6667	8,71703	,965	-19,9341	31,2675
	T2	8,5000	8,71703	,864	-17,1008	34,1008
	T4	-27,1667*	8,71703	,034	-52,7675	-1,5659
T4	T0	38,5000*	8,71703	,001	12,8992	64,1008
	T1	32,8333*	8,71703	,007	7,2325	58,4341
	T2	35,6667*	8,71703	,003	10,0659	61,2675
	T3	27,1667*	8,71703	,034	1,5659	52,7675

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 227,960.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

COLES

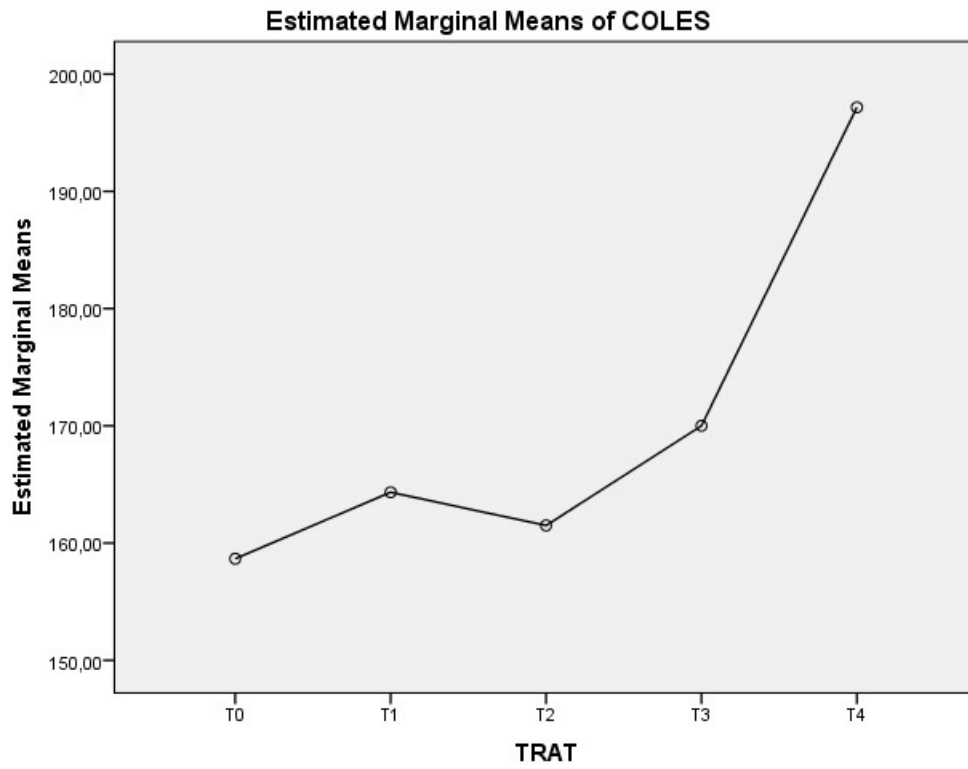
Tukey HSD

TRAT	N	Subset	
		1	2
T0	6	158,6667	
T2	6	161,5000	
T1	6	164,3333	
T3	6	170,0000	
T4	6		197,1667
Sig.		,694	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.
 The error term is Mean Square(Error) = 227,960.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.



Between-Subjects Factors

		N
TRAT	T0	6
	T1	6
	T2	6
	T3	6
	T4	6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: TRIGL

F	df1	df2	Sig.
1,295	4	25	,299

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.
a. Design: Intercept + TRAT

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TRIGL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26405,000 ^a	4	6601,250	4,413	,008
Intercept	280333,333	1	280333,333	187,400	,000
TRAT	26405,000	4	6601,250	4,413	,008
Error	37397,667	25	1495,907		
Total	344136,000	30			
Corrected Total	63802,667	29			

a. R Squared = ,414 (Adjusted R Squared = ,320)

TRAT

Dependent Variable: TRIGL

TRAT	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
T0	118,167	15,790	85,647	150,686
T1	40,167	15,790	7,647	72,686
T2	116,333	15,790	83,814	148,853
T3	93,333	15,790	60,814	125,853
T4	115,333	15,790	82,814	147,853

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TRIGL
Tukey HSD

(I) TRAT		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T0	T1	78,0000 [*]	22,33015	,014	12,4192	143,5808
	T2	1,8333	22,33015	1,000	-63,7474	67,4141
	T3	24,8333	22,33015	,799	-40,7474	90,4141
	T4	2,8333	22,33015	1,000	-62,7474	68,4141
T1	T0	-78,0000 [*]	22,33015	,014	-143,5808	-12,4192
	T2	-76,1667 [*]	22,33015	,017	-141,7474	-10,5859
	T3	-53,1667	22,33015	,154	-118,7474	12,4141
	T4	-75,1667 [*]	22,33015	,019	-140,7474	-9,5859
T2	T0	-1,8333	22,33015	1,000	-67,4141	63,7474
	T1	76,1667 [*]	22,33015	,017	10,5859	141,7474
	T3	23,0000	22,33015	,839	-42,5808	88,5808
	T4	1,0000	22,33015	1,000	-64,5808	66,5808
T3	T0	-24,8333	22,33015	,799	-90,4141	40,7474

	T1	53,1667	22,33015	,154	-12,4141	118,7474
	T2	-23,0000	22,33015	,839	-88,5808	42,5808
	T4	-22,0000	22,33015	,859	-87,5808	43,5808
T4	T0	-2,8333	22,33015	1,000	-68,4141	62,7474
	T1	75,1667	22,33015	,019	9,5859	140,7474
	T2	-1,0000	22,33015	1,000	-66,5808	64,5808
	T3	22,0000	22,33015	,859	-43,5808	87,5808

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1495,907.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

TRIGL

Tukey HSD

TRAT	N	Subset	
		1	2
T1	6	40,1667	
T3	6	93,3333	93,3333
T4	6		115,3333
T2	6		116,3333
T0	6		118,1667
Sig.		,154	,799

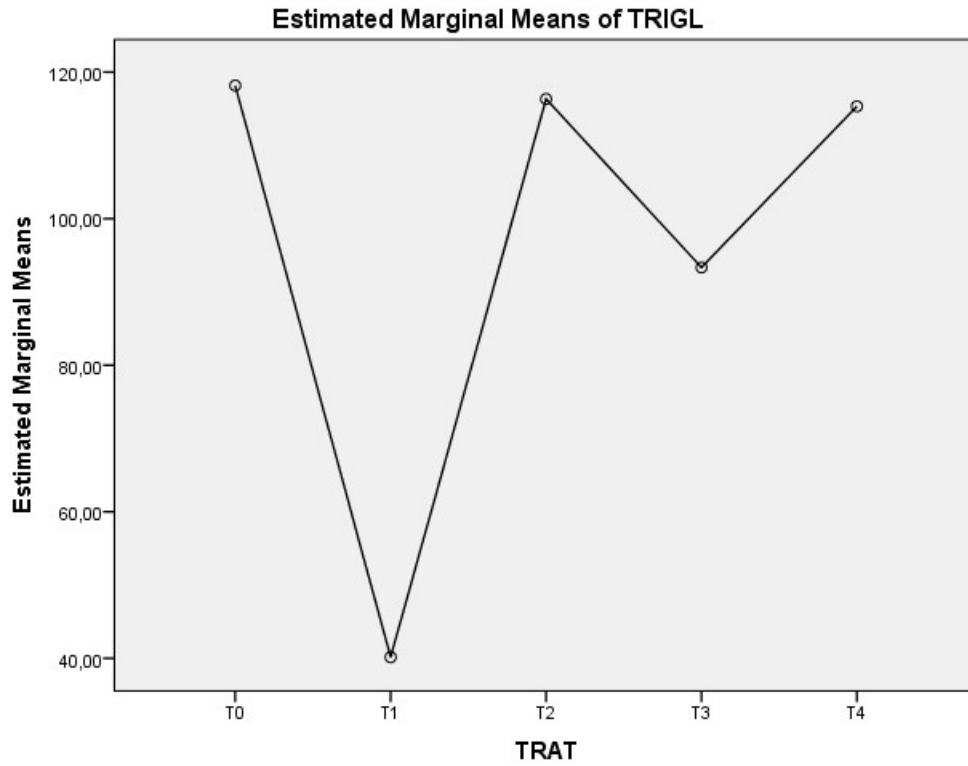
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1495,907.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.



Between-Subjects Factors

		N
TRAT	T0	6
	T1	6
	T2	6
	T3	6
	T4	6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: PROT

F	df1	df2	Sig.
1,979	4	25	,129

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + TRAT

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PROT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,645 ^a	4	,411	2,116	,109
Intercept	404,067	1	404,067	2079,247	,000
TRAT	1,645	4	,411	2,116	,109
Error	4,858	25	,194		
Total	410,570	30			
Corrected Total	6,503	29			

a. R Squared = ,253 (Adjusted R Squared = ,133)

TRAT

Dependent Variable: PROT

TRAT	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
T0	3,483	,180	3,113	3,854
T1	3,450	,180	3,079	3,821
T2	3,767	,180	3,396	4,137
T3	3,567	,180	3,196	3,937
T4	4,083	,180	3,713	4,454

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PROT

Tukey HSD

(I) TRAT		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T0	T1	,0333	,25451	1,000	-,7141	,7808
	T2	-,2833	,25451	,798	-1,0308	,4641
	T3	-,0833	,25451	,997	-,8308	,6641
	T4	-,6000	,25451	,161	-1,3475	,1475
T1	T0	-,0333	,25451	1,000	-,7808	,7141
	T2	-,3167	,25451	,726	-1,0641	,4308
	T3	-,1167	,25451	,990	-,8641	,6308
	T4	-,6333	,25451	,125	-1,3808	,1141
T2	T0	,2833	,25451	,798	-,4641	1,0308
	T1	,3167	,25451	,726	-,4308	1,0641
	T3	,2000	,25451	,932	-,5475	,9475
	T4	-,3167	,25451	,726	-1,0641	,4308
T3	T0	,0833	,25451	,997	-,6641	,8308
	T1	,1167	,25451	,990	-,6308	,8641
	T2	-,2000	,25451	,932	-,9475	,5475
	T4	-,5167	,25451	,281	-1,2641	,2308
T4	T0	,6000	,25451	,161	-,1475	1,3475
	T1	,6333	,25451	,125	-,1141	1,3808
	T2	,3167	,25451	,726	-,4308	1,0641

T3	,5167	,25451	,281	-,2308	1,2641
----	-------	--------	------	--------	--------

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = ,194.

PROT

Tukey HSD

TRAT	N	Subset	
		1	
T1	6	3,4500	
T0	6	3,4833	
T3	6	3,5667	
T2	6	3,7667	
T4	6	4,0833	
Sig.		,125	

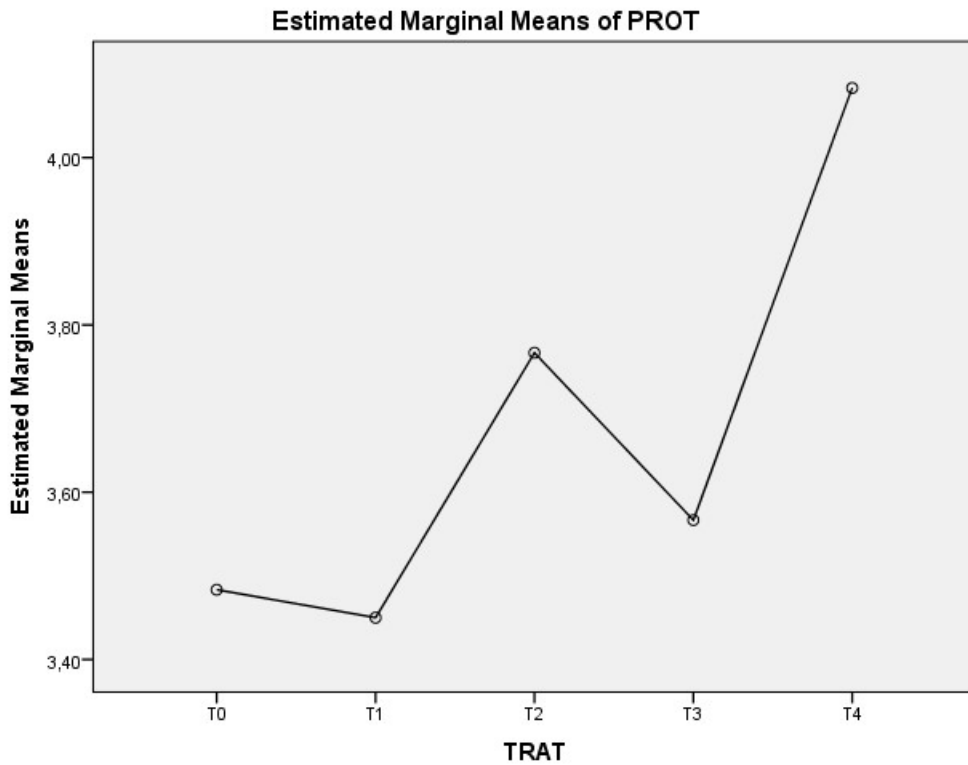
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

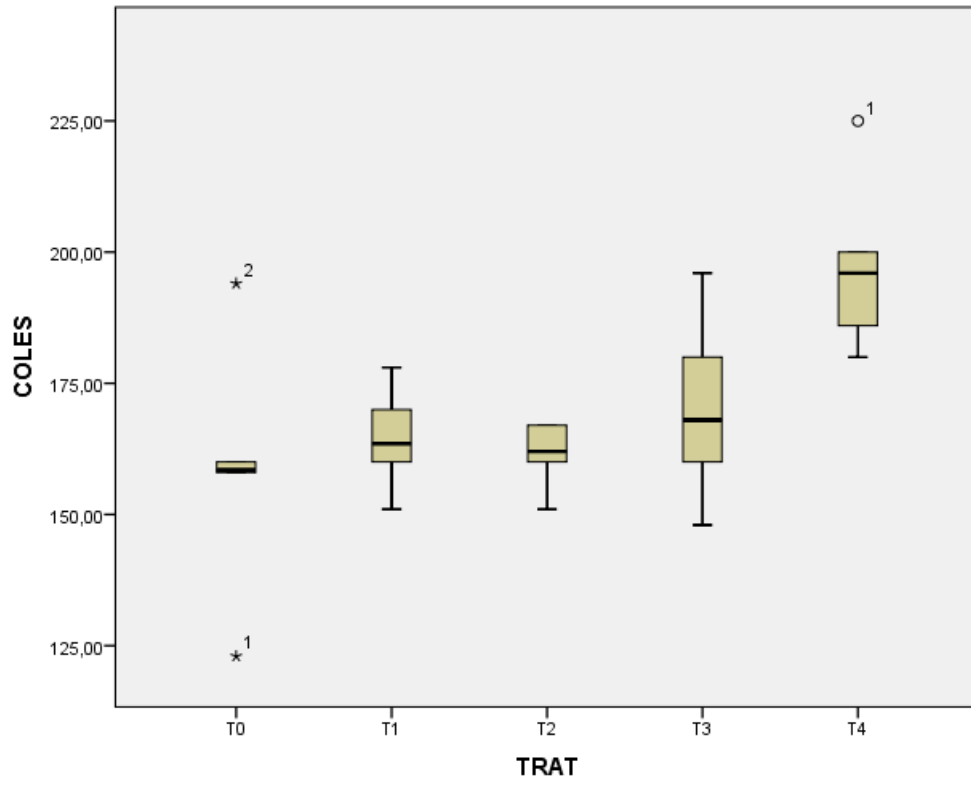
Based on observed means.

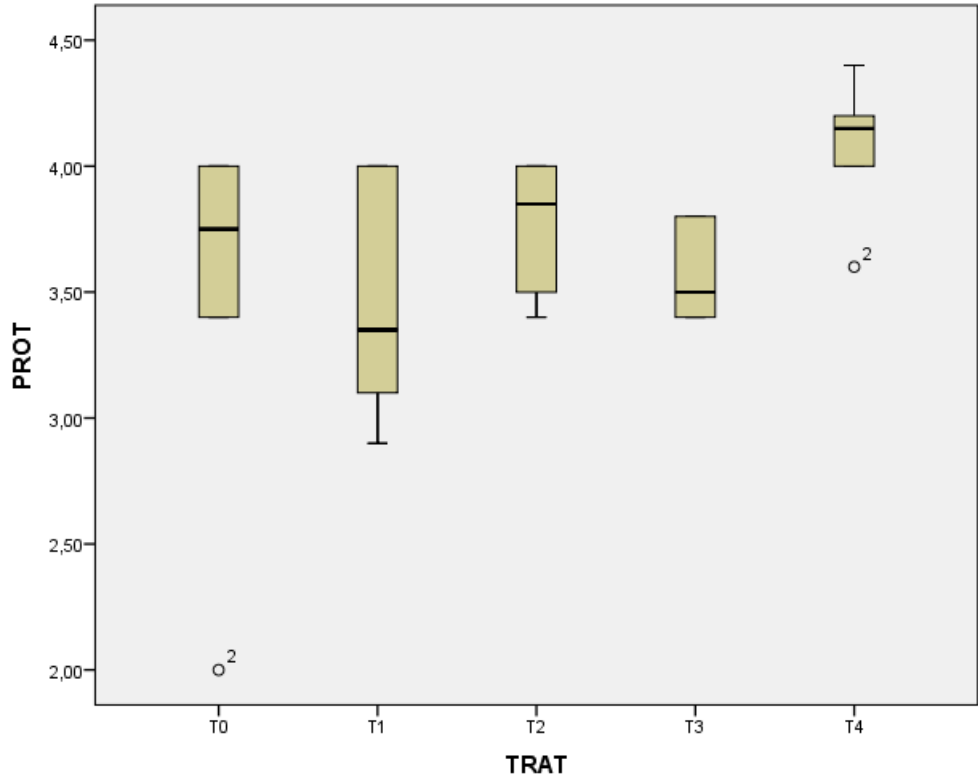
The error term is Mean Square(Error) = ,194.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.







Between-Subjects Factors

		N
TRAT	T0	6
	T1	6
	T2	6
	T3	6
	T4	6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: COLES

F	df1	df2	Sig.
2,359	4	25	,081

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + TRAT

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: COLES

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10871,467 ^a	4	2717,867	5,384	,003
Intercept	891308,033	1	891308,033	1765,736	,000
TRAT	10871,467	4	2717,867	5,384	,003
Error	12619,500	25	504,780		
Total	914799,000	30			
Corrected Total	23490,967	29			

a. R Squared = ,463 (Adjusted R Squared = ,377)

TRAT

Dependent Variable: COLES

TRAT	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
T0	158,667	9,172	139,776	177,557
T1	164,333	9,172	145,443	183,224
T2	161,500	9,172	142,609	180,391
T3	210,000	9,172	191,109	228,891
T4	167,333	9,172	148,443	186,224

Multiple Comparisons

Dependent Variable: COLES
Tukey HSD

(I) TRAT		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T0	T1	-5,6667	12,97151	,992	-43,7623	32,4290
	T2	-2,8333	12,97151	,999	-40,9290	35,2623
	T3	-51,3333 [*]	12,97151	,005	-89,4290	-13,2377
	T4	-8,6667	12,97151	,961	-46,7623	29,4290
T1	T0	5,6667	12,97151	,992	-32,4290	43,7623
	T2	2,8333	12,97151	,999	-35,2623	40,9290
	T3	-45,6667 [*]	12,97151	,013	-83,7623	-7,5710
	T4	-3,0000	12,97151	,999	-41,0956	35,0956
T2	T0	2,8333	12,97151	,999	-35,2623	40,9290
	T1	-2,8333	12,97151	,999	-40,9290	35,2623
	T3	-48,5000 [*]	12,97151	,008	-86,5956	-10,4044
	T4	-5,8333	12,97151	,991	-43,9290	32,2623
T3	T0	51,3333 [*]	12,97151	,005	13,2377	89,4290
	T1	45,6667 [*]	12,97151	,013	7,5710	83,7623
	T2	48,5000 [*]	12,97151	,008	10,4044	86,5956
	T4	42,6667 [*]	12,97151	,023	4,5710	80,7623
T4	T0	8,6667	12,97151	,961	-29,4290	46,7623
	T1	3,0000	12,97151	,999	-35,0956	41,0956
	T2	5,8333	12,97151	,991	-32,2623	43,9290

T3	-42,6667	12,97151	,023	-80,7623	-4,5710
----	----------	----------	------	----------	---------

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 504,780.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Between-Subjects Factors

		N
TRAT	T0	6
	T1	6
	T2	6
	T3	6
	T4	6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: TRIGL

F	df1	df2	Sig.
,751	4	25	,567

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + TRAT

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TRIGL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	53356,467 ^a	4	13339,117	12,441	,000
Intercept	344755,200	1	344755,200	321,548	,000
TRAT	53356,467	4	13339,117	12,441	,000
Error	26804,333	25	1072,173		
Total	424916,000	30			
Corrected Total	80160,800	29			

a. R Squared = ,666 (Adjusted R Squared = ,612)

TRAT

Dependent Variable: TRIGL

TRAT	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
T0	118,167	13,368	90,635	145,698
T1	40,167	13,368	12,635	67,698
T2	116,333	13,368	88,802	143,865
T3	91,333	13,368	63,802	118,865
T4	170,000	13,368	142,469	197,531

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TRIGL

Tukey HSD

(I) TRAT	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval

		(I-J)			Lower Bound	Upper Bound
T0	T1	78,0000*	18,90479	,003	22,4791	133,5209
	T2	1,8333	18,90479	1,000	-53,6876	57,3543
	T3	26,8333	18,90479	,621	-28,6876	82,3543
	T4	-51,8333	18,90479	,076	-107,3543	3,6876
T1	T0	-78,0000*	18,90479	,003	-133,5209	-22,4791
	T2	-76,1667*	18,90479	,004	-131,6876	-20,6457
	T3	-51,1667	18,90479	,081	-106,6876	4,3543
	T4	-129,8333*	18,90479	,000	-185,3543	-74,3124
T2	T0	-1,8333	18,90479	1,000	-57,3543	53,6876
	T1	76,1667*	18,90479	,004	20,6457	131,6876
	T3	25,0000	18,90479	,680	-30,5209	80,5209
	T4	-53,6667	18,90479	,062	-109,1876	1,8543
T3	T0	-26,8333	18,90479	,621	-82,3543	28,6876
	T1	51,1667	18,90479	,081	-4,3543	106,6876
	T2	-25,0000	18,90479	,680	-80,5209	30,5209
	T4	-78,6667*	18,90479	,003	-134,1876	-23,1457
T4	T0	51,8333	18,90479	,076	-3,6876	107,3543
	T1	129,8333*	18,90479	,000	74,3124	185,3543
	T2	53,6667	18,90479	,062	-1,8543	109,1876
	T3	78,6667*	18,90479	,003	23,1457	134,1876

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1072,173.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

TRIGL

Tukey HSD

TRAT	N	Subset		
		1	2	3
T1	6	40,1667		
T3	6	91,3333	91,3333	
T2	6		116,3333	116,3333
T0	6		118,1667	118,1667
T4	6			170,0000
Sig.		,081	,621	,062

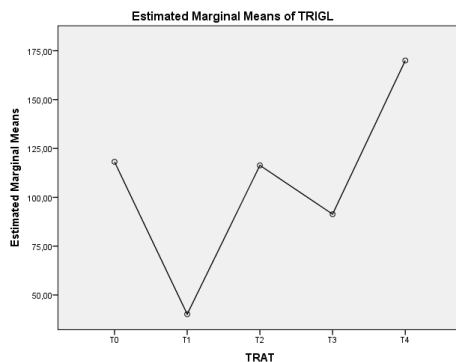
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1072,173.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.



Between-Subjects Factors

		N
<i>TRAT</i>	<i>T0</i>	6
	T1	6
	T2	6
	T3	6
	T4	6
		6

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: PROT

F	df1	df2	Sig.
1,661	4	25	,191

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + TRAT

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PROT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,151 ^a	4	,288	1,413	,259

Intercept	395,307	1	395,307	1940,951	,000
TRAT	1,151	4	,288	1,413	,259
Error	5,092	25	,204		
Total	401,550	30			
Corrected Total	6,243	29			

a. R Squared = ,184 (Adjusted R Squared = ,054)

TRAT

Dependent Variable: PROT

TRAT	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
T0	3,483	,184	3,104	3,863
T1	3,450	,184	3,071	3,829
T2	3,767	,184	3,387	4,146
T3	3,950	,184	3,571	4,329
T4	3,500	,184	3,121	3,879

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PROT

Tukey HSD

(I) TRAT		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T0	T1	,0333	,26055	1,000	-,7319	,7985
	T2	-,2833	,26055	,811	-1,0485	,4819
	T3	-,4667	,26055	,401	-1,2319	,2985
	T4	-,0167	,26055	1,000	-,7819	,7485
T1	T0	-,0333	,26055	1,000	-,7985	,7319
	T2	-,3167	,26055	,743	-1,0819	,4485
	T3	-,5000	,26055	,334	-1,2652	,2652
	T4	-,0500	,26055	1,000	-,8152	,7152
T2	T0	,2833	,26055	,811	-,4819	1,0485
	T1	,3167	,26055	,743	-,4485	1,0819
	T3	-,1833	,26055	,954	-,9485	,5819
	T4	,2667	,26055	,842	-,4985	1,0319
T3	T0	,4667	,26055	,401	-,2985	1,2319
	T1	,5000	,26055	,334	-,2652	1,2652
	T2	,1833	,26055	,954	-,5819	,9485
	T4	,4500	,26055	,436	-,3152	1,2152
T4	T0	,0167	,26055	1,000	-,7485	,7819
	T1	,0500	,26055	1,000	-,7152	,8152
	T2	-,2667	,26055	,842	-1,0319	,4985
	T3	-,4500	,26055	,436	-1,2152	,3152

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,204.

PROT

Tukey HSD

TRAT	N	Subset	
		1	
T1	6	3,4500	
T0	6	3,4833	
T4	6	3,5000	
T2	6	3,7667	
T3	6	3,9500	
Sig.			,334

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,204.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

b. Alpha = ,05.

VALORES DE ANTEICUERPOS

New Castle

T0	T1	T2	T3	T4
2	4	4	4	4
4	4	16	4	4
2	4	16	8	4
2	2	4	32	8
2	2	16	16	8
0	4	4	4	2

Gumboro

T0	T1	T2	T3	T4
290	52	153	43	290
201	18	688	0	560

775	26	26	61	331
570	43	0	43	3
465	311	35	677	26
753	61	52	423	14

Bronchitis

T0	T1	T2	T3	T4
2	2	4	4	4
2	4	4		4
2	4	2	4	4
4	2	2	32	16
4	4	4	32	2
4	4	4	4	8

ANEXO C. Parametros productivos.

trat	rep	p_INC	GP	Consumo	GP_in	CA
T0	1	42,25	196,75	4366	977	4,47
T0	2	41,38	201,34	4828	1104	4,37
T0	3	51,14	145,43	4015	929	4,32
T1	1	38,29	679,43	6698	4375	1,53
T1	2	40,38	568,88	7320	4133	1,77
T1	3	40,63	653,75	7184	4793	1,50
T2	1	41,75	260,25	4378	1363	3,21
T2	2	44,00	235,33	4209	1240	3,39
T2	3	42,00	225,43	4353	1430	3,04
T3	1	40,00	208,29	4455	1309	3,40
T3	2	39,25	192,13	5697	1353	4,21
T3	3	41,14	171,61	3492	404	8,64
T4	1	40,86	337,39	4082	1084	3,77
T4	2	38,25	248,35	4799	966	4,97
T4	3	37,57	243,43	5440	1495	3,64

GP

Tukey HSD,a,b

Tratamiento	N	Subset	
		1	2
T0	3	181,173333	
T3	3	190,676667	
T2	3	240,336667	
T4	3	276,390000	
T1	3		634,020000
Sig.		,084	1,000

Consumo

Tukey HSD

Tratamiento	N	Subset	
		1	2
T2	3	4313,33333	
T0	3	4403,00000	
T3	3	4548,00000	
T4	3	4773,66667	
T1	3		7067,33333
Sig.		,891	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 393006,800.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = 0,05.

CA

Tukey HSD

Tratamiento	N	Subset	
		1	2
T1	3	1,60000	
T2	3	3,21333	3,21333
T4	3	4,12666	4,12666
T0	3	4,38666	4,38666
T3	3		5,41666
Sig.		,142	,306

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,710.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = 0,05.

