



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE PROBIÓTICOS EN EL AGUA DE
BEBIDA SOBRE LA MICROFLORA INTESTINAL DE POLLOS
BROILER**

MARIA JOSÉ VARGAS DONOSO

Proyecto de Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción
Animal.

PROFESOR GUÍA: CAROLINA PAZ VALENZUELA VENEGAS

SANTIAGO, CHILE

2014



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE PROBIÓTICOS EN EL AGUA DE
BEBIDA SOBRE LA MICROFLORA INTESTINAL DE POLLOS
BROILER**

MARIA JOSÉ VARGAS DONOSO

Proyecto de Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción
Animal.

Nota Final

Prof. Guía: Carolina Paz Valenzuela V.

Profesor Corrector: María Sol Morales S.

Profesor Corrector: Patricio Retamal M.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Quiero dedicar este último trabajo para mi vida Universitaria de Pregrado, a mi madre Bárbara y a mi padre Christian, por haber sido siempre un apoyo fundamental en mi vida académica y siempre haber estado ahí para mí; por contenerme y ayudarme en todo lo que necesitara y más. Por sufrir y alegrarse conmigo en este camino.

También deseo dedicarlo a mis hermanos Isabella y Cristóbal, por siempre haberme dado aliento y apoyo. Por siempre haberme recordado las fechas y los trabajos que me faltaban ya que a fuerza de repeticiones me hicieron ser más responsable.

Y por último, a mis amigos, amigas y familiares, que siempre me acompañaron, alentaron y recordaron muy amablemente todo lo que me faltaba por hacer. En especial a mi gran amigo Claudio, quien me ayudó en la búsqueda de información.

Debo agradecer a mi profesora guía, Carolina Valenzuela, por haber sido una excelente profesional, muy amable y servicial, siempre dispuesta a tenerme paciencia y ayudarme en todo lo que necesité.

Y también a la Universidad, por haberme formado y darme las herramientas para tener una vida profesional.

A todos ustedes, les estaré eternamente agradecida.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Introducción.....	1
Objetivos.....	5
<i>Objetivo general</i>	5
<i>Objetivos específicos</i>	5
Materiales y métodos.....	6
<i>Probiótico</i>	6
<i>Manejo de animales</i>	6
<i>Diseño experimental</i>	7
<i>Toma de muestra de heces</i>	8
<i>Enumeración de poblaciones bacterianas saprófitas</i>	9
<i>Enumeración de poblaciones bacterianas patógenas</i>	9
<i>Análisis estadístico</i>	10
Resultados y discusión.....	11
<i>Recuento Aerobios Mesófilos del probiótico</i>	11
<i>Efecto del probiótico sobre la flora saprófita</i>	14
<i>Efecto del probiótico sobre la flora patógena</i>	19
Conclusiones.....	21
Bibliografía.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	6
Tabla 2.....	9
Tabla 3.....	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	8
Figura 2.....	11
Figura 3.....	15
Figura 4.....	17

RESUMEN

Introducción: La alta demanda a nivel mundial por productos cárnicos de origen avícola, ha generado en la industria una búsqueda de nuevas alternativas para mejorar el rendimiento productivo de los pollos broiler. A esto se suma la prohibición por parte de la Unión Europea en el año 2006 del uso de antibióticos como promotores de crecimiento. Así el uso de probióticos ha sido estudiado con este enfoque, pero también por su capacidad de mejorar el estado sanitario de los animales evitando la proliferación de microorganismos patógenos a nivel intestinal. Si bien hay bastante literatura en relación al efecto-probiótico en pollos broiler, generalmente éstos se incluyen a través de la alimentación. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre la microflora intestinal de pollos broiler. **Métodos:** El probiótico en estado líquido fue proporcionado por una empresa privada, y se le realizó un recuento de aeróbios mesófilos (RAM) al día 22 y 42 de estudio. Un total de 240 pollos broiler Ross 308, de 1 día de edad se distribuyeron al azar en 3 grupos, con 4 réplicas cada uno (N=20): Control (sin probiótico), tratamiento 1 (T1, 35 mL de probiótico/20 pollos) y tratamiento 2 (T2, 70 mL/20 pollos). Los pollos se criaron por 42 días, y el probiótico se incorporó una vez al día en el agua de bebida. Al día 22 y 42 de estudio se tomaron muestras de heces y se cuantificaron poblaciones saprófitas (RAM, enterobacterias, coliformes totales y anaerobios totales) y patógenas (*Salmonella enterica* y *Escherichia coli* enteropatógena), según métodos convencionales microbiológicos. **Resultados:** El RAM del probiótico al momento de su preparación fue de 6,8 log₁₀ UFC/mL, disminuyendo los días 22 (4,8 ± 0,02 log₁₀ UFC/mL) y 42 (3,8 ± 0,03 log₁₀ UFC/mL) (p<0,05). Al día 22 no hubo un efecto del probiótico sobre el RAM. Se observó un efecto del probiótico sobre las siguientes poblaciones: enterobacterias, coliformes totales (sólo en grupo T2) y anaerobios, en donde su inclusión disminuyó significativamente éstas poblaciones. También se observó una relación dosis-efecto en enterobacterias y coliformes totales. Al día 42 sólo se mantuvo el efecto supresor del probiótico sobre la población de anaerobios, en el cual también se observó una mayor disminución de este grupo con un incremento de la dosis. No se cuantificaron poblaciones patógenas en ninguno de los tres grupos.

ABSTRACT

Introduction: The constant growing demand worldwide for poultry meat products has generated on the industry, a search of new alternatives to improve the productivity of the broiler chickens. To this, it adds the prohibition of the European Union in year 2006 for the use of antibiotics as growth promoters in animals. So the use of probiotics has been studied from this approach, but also for their aptitude to improve the sanitary condition of the animals, avoiding the proliferation of pathogenic microorganisms at intestinal level. Even though there is a load of literature in relation to the probiotic effect in broiler chickens, generally these are included in food. **Objectives:** Evaluate the effect of the addition of probiotics in the drinking water on the intestinal microflora of broiler chickens. **Methods:** The probiotic, in liquid condition, was provided by a private company (Oikos Chile Ltda.), and a total mesophilic aerobic count (TMA) was realized on the 22nd and 42nd days of study. A total of 240, 1 day old broiler Ross 308 chicks, were distributed at random in 3 groups, with 4 replies each one (N=20): Control (without the probiotic), treatment 1 (T1, 35 mL of probiotic/20 chickens) and treatment 2 (T2, 70 mL/20 chickens). Chickens were kept for 42 days, and the probiotic was added once a day via drinking water. On the 22nd and 42nd days of study, fecal samples were taken and saprophytic (TMA, enterobacteriaceae, total coliform and total anaerobes) and pathogenic (*Salmonella enterica* and enteropathogenic *Escherichia coli*) populations were quantified, according to conventional microbiological counting methods. **Results:** The TMA of the probiotic at the moment of its preparation was 6,8 log₁₀ UFC/mL, declining on both, the 22nd (4,8 ± 0,02 log₁₀ UFC/mL) and 42nd (3,8 ± 0,03 log₁₀ UFC/mL) (p<0,05). At the 22nd day, there was no effect on the TMA from the probiotic. The effect of the probiotic was observed on the following populations: enterobacteriaceae, total coliform (only in group T2) and anaerobes, where its incorporation decreased significantly these populations. Also a dose – effect relation was observed in enterobacteriaceae and total coliform. On the 42nd, the suppressing effect of the probiotic was only kept on the anaerobic population, in which also was observed a major decrease of this group by an increase of the dose. Pathogenic populations were not quantified in any of the three groups.

INTRODUCCIÓN

Las aves de corral actualmente se crían de manera intensiva en sistemas densamente poblados con el objetivo de alcanzar altos niveles de eficiencia productiva y económica. Durante este proceso los pollos broiler o de carne se estresan fácilmente por una serie de factores. El uso de probióticos en la alimentación de broilers está ganando terreno para contrarrestar y minimizar los efectos del estrés (Kabir *et al.*, 2004). Por otra parte, la prohibición del uso de los antibióticos en la Unión Europea el año 2006 como promotores del crecimiento ha generado un cambio en favor de la inclusión de probióticos en la alimentación para aumentar el rendimiento productivo de los pollos broiler (Fuller, 1989).

La flora bacteriana intestinal normal de los pollos broiler es una compleja y dinámica población de microorganismos, que se adquiere en el momento del nacimiento desde el medio ambiente, colonizando el tracto digestivo en función de la edad del animal (Amit-Romach *et al.*, 2004). La microflora normal hace referencia a microorganismos que habitan a lo largo del tracto gastrointestinal, pero principalmente en el intestino inferior, del animal desde el momento de su colonización en las primeras horas de vida, y que tienen un importante papel en la salud y crecimiento del hospedero (La Regione *et al.*, 2005). Estas poblaciones se pueden cuantificar por varios métodos, algunos de los más utilizados son, (1) Recuento de aeróbios mesófilos (RAM), el cual contabiliza organismos que crecen en temperaturas óptimas de 30-37°C y sus representantes son algunas especies como: *Proteus* spp., enterococos y pseudomonas mesófilas. Dentro de la flora intestinal benéfica se mencionan *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que estimulan el crecimiento y la actividad de otras bacterias, por lo que son consideradas cepas probióticas (ICMSF, 2000). (2) *Enterobacteriae* son organismos que habitan normalmente el sistema entérico y algunos representantes son los géneros *Erwinia* spp. y *Serratia* spp. (ICMSF, 2000). (3) Coliformes totales son especies que habitan en el intestino y su presencia indica, por lo general, contaminación fecal en los alimentos (ICMSF, 2000). Éstos hacen referencia al grupo coliaerogenes, el cual está compuesto por los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (ICMSF, 2000). (4) Anaerobios totales que incluyen bacterias anaerobias

obligadas, como por ejemplo *Clostridium perfringens*, y microorganismos anaerobios facultativos pertenecientes a las *Enterobacteriaceae*, como estreptococos fecales y estafilococos (ICMSF, 2000).

En relación a los microorganismos patógenos se mencionan entre los más importantes *E. coli* enteropatógena, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. (Amit-Romach *et al.*, 2004). Los cuales son potencialmente zoonóticos, e incluso cuadros causados por *Campylobacter yeyuni* se han convertido en la principal zoonosis a nivel mundial (Baffoni *et al.*, 2012). Desbalances en la flora bacteriana que tiendan al aumento de los microorganismos patógenos generan enfermedades, pérdidas económicas, y han sido foco de graves zoonosis transmitidas por los alimentos de origen animal (Amit-Romach *et al.*, 2004; Baffoni *et al.*, 2012; Tellez *et al.*, 2012). Por tanto, las investigaciones actuales están dirigidas al estudio de microorganismos saprófitos que habitan comúnmente el ambiente intestinal de los animales, que puedan generar un equilibrio en la flora intestinal, como los probióticos, y también otras funciones benéficas.

La Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), ha definido los probióticos como microorganismos vivos, que confieren beneficios en la salud al hospedero cuando se les administra en cantidades adecuadas (Singh *et al.*, 2011). El uso de probióticos se ha investigado en varios modelos animales, dentro de los más utilizados se destacan: roedores, cerdos, y aves de corral (Gaggia *et al.*, 2010). Específicamente en pollos, se han evaluado productos basados en bacterias ácido lácticas (BAL), que se encuentran normalmente en el tracto gastrointestinal de vertebrados e invertebrados. Las BAL son principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y *Bifidobacterium*, entre otros (Baffoni *et al.*, 2012). Los lactobacilos son conocidos por sus capacidades de adhesión a las paredes de la mucosa intestinal, la inhibición de bacterias patógenas mediante varios mecanismos de acción y su tolerancia a las secreciones gástricas e intestinales (Lin *et al.*, 2007). Es uno de los géneros bacterianos más utilizados en la elaboración de probióticos, y tiene efectos antagónicos contra bacterias patógenas, como lo son la *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* y algunas variantes enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* (Lin *et al.*, 2007). Algunas especies se adhieren específicamente al

epitelio intestinal de las aves como es el caso de *L. fermentum* cepas PG1, PG3, PS1, PSM1, PL1 y PLM2, lo cual es importante ya que gracias a esta adhesión se produce una exclusión competitiva de los microorganismos patógenos (Lin *et al.*, 2007). Los probióticos a base de enterococos deben ser bien diseñados, ya que varias especies poseen factores de virulencia como pili, adhesinas, hemolisinas, entre otros. (Franz *et al.*, 2011). Se ha demostrado en aves sometidas a rutinas de alimentación con probióticos, que estas aumentan significativamente su productividad (mejorando la ganancia de peso diaria y eficiencia de conversión alimentaria), además se observó un cambio en la composición de la flora cecal, caracterizado por un aumento de bifidobacterias, lactobacilos y cocoides Gram (+). También presentaron efectos beneficiosos en la absorción de minerales, contenido de los triglicéridos en suero y efectos antioxidantes, que fueron dosis y edad dependiente (Franz *et al.*, 2011).

Una segunda clasificación de cepas probióticas son aquellos microorganismos que no se encuentran normalmente en el tracto gastrointestinal (flora alóctona) del género *Bacillus*. El interés por el uso de *Bacillus* se ha incrementado en el último tiempo, y su uso se fundamenta en la capacidad de éstos de esporular, lo que les confiere una alta resistencia a las condiciones ácidas del estómago (a diferencia de los *Lactobacillus*), y a las condiciones de almacenamiento (Cutting, 2011). En estudios con aves, se ha observado que la administración oral de esporas de *B. subtilis* reduce los casos de infección por *Salmonella enterica* serotipo Enteriditis, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* O78:K80 (Cutting, 2011).

Se han descrito bastantes efectos benéficos del uso de probióticos en pollos broiler, a través de diferentes mecanismos de acción: (1) efecto sanitario, a través del incremento de la resistencia a la colonización de patógenos en el intestino (Amalaradjou y Bhunia, 2012; Del Piano *et al.*, 2006), por la competencia por nutrientes entre probióticos y patógenos, la producción de ácidos orgánicos que alteran el pH del sector y generación de citoquinas, que generan una disminución de microorganismos patógenos (Lin *et al.*, 2007). A algunas cepas manipuladas genéticamente (*L. reuteri* Pg4) poseen la capacidad de secretar β -glucanasa que disminuye la capa mucosa intestinal, disminuyendo la concentración de patógenos y la

acumulación de toxinas que éstos producen, generando directamente una mejor absorción de nutrientes por parte de los animales (Yu *et al.*, 2008). (2) Mejora de la función de barrera intestinal, a nivel de las *tight junctions*, impidiendo la adhesión de patógenos a la mucosa, y reforzando las uniones célula-célula en el epitelio intestinal (Amalaradjou y Bhunia, 2012). (3) Estimulación de la respuesta inmune, ya que actúan como bio-reguladores de la flora intestinal, neutralizando enterotoxinas y reforzando las defensas naturales del hospedero (Anadón *et al.*, 2006; Giannenas *et al.*, 2012). (4) Producción de nutrientes, ya que proveen productos finales de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos, tales como ácidos orgánicos de cadena corta que pueden ser utilizadas por el hospedero (Amalaradjou y Bhunia, 2012; Singh *et al.*, 2011).

Generalmente los probióticos son administrados a través del alimento (Baffoni *et al.*, 2012; Giannenas *et al.*, 2012), lo cual presenta una gran problemática ya que el producto debe estar completamente homogeneizado en las raciones, y las células vivas pueden alterarse mediante el procesamiento térmico y mecánico de las dietas. Actualmente existen pocos estudios en donde se hayan usado probióticos vía agua de bebida, los cuales han determinado el efecto de éstos sobre parámetros productivos principalmente e inmunidad de pollos broiler (Kabir *et al.*, 2004; Timmerman *et al.*, 2006). Por lo tanto, el objetivo de la presente memoria de título fue determinar el efecto de la inclusión de una nueva formulación de probióticos entregada en el agua de bebida sobre la microflora intestinal de pollos broiler.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre la microflora intestinal de pollos broiler.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre la microflora saprófita de pollos broiler.
2. Evaluar el efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre la microflora patógena de pollos broiler: *Escherichia coli* enteropatógena y *Salmonella enterica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Probiótico

El probiótico utilizado correspondió al producto comercial ProBio Balance™ Original (Oikos Chile Ltda.), el cual tiene presentación líquida, y se almacenó en un recipiente plástico de 20 L, en condiciones de campo. Las cepas que lo componen se encuentran en una concentración de 6×10^6 UFC/mL, y su composición se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición microbiana del probiótico utilizado (ProBio Balance™).

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> (<i>Streptococcus lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	

Se realizó un RAM los días 22 y 42 de estudio, a partir de alícuotas de 50 mL del probiótico en triplicado, las cuales fueron analizadas en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), para determinar la viabilidad de las cepas probióticas durante el almacenamiento.

Manejo de animales

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de FAVET. Se utilizaron 240 pollos Broiler machos de un día de edad pertenecientes a la línea genética Ross 308. El estudio se llevó a cabo en la “Unidad Experimental de Producción y Nutrición Avícola” de FAVET.

Antes de la llegada de los animales la unidad experimental fue desinfectada con DUPLALIM® (amonios cuaternarios y aldehído glutárico) (Veterquímica S.A, Chile). Los corrales se encuentran ubicados en un pabellón experimental de estructura convencional con ventilación natural mediante cortinas desplegadas a lo largo de la unidad experimental, y calefaccionado por campanas de gas con control de temperatura por termostato. Se registraron diariamente las temperaturas (mañana, mediodía y tarde) con un termómetro de mínimas y máximas, durante todo el período productivo. La densidad poblacional y el programa de temperatura y luz se realizó según la Guía de Manejo del Pollo de Engorde (Aviagen, 2009). Los animales se mantuvieron en corrales colectivos con camas de viruta de madera (20 cm de altura), con un régimen de agua potable y alimentación *ad libitum*. El alimento fue adquirido en la división industrial para pollos broiler de Alimentos Cisternas S.A., para los períodos de inicio (1 - 22 días) y finalización (22 - 42 días). Al alimento se le realizó un análisis químico proximal (AOAC, 1996) en duplicado en el Laboratorio de Nutrición de FAVET. Ambos alimentos cumplieron con los requerimientos nutricionales de pollos broiler (NRC, 1994).

Diseño experimental

Los animales fueron aleatoriamente divididos en 3 grupos:

1. Control (C = sin probiótico).
2. Tratamiento 1 (T1 = 35 mL de probiótico/20 pollos/día).
3. Tratamiento 2 (T2 = 70 mL de probiótico/20 pollos/día).

A su vez cada grupo (N=80) fue dividido en 4 réplicas de 20 animales cada uno. La dosis de probióticos utilizada fue establecida por la empresa Oikos Chile Ltda. Los probióticos se administraron de forma manual utilizando una jeringa de 20 mL, y fueron incorporados homogéneamente al agua de bebida contenida en bebederos tipo campana, diariamente a la misma hora (3 pm) durante 42 días. La dosis se mantuvo en la misma concentración durante todo el estudio según requerimiento de la empresa.

Toma de muestras de heces

En la Figura 1 se presenta un diagrama que explica la metodología utilizada para la recolección de muestras de heces, para la enumeración de bacterias saprófitas y patógenas, cuyos puntos fundamentales se detallan a continuación.



Figura 1. Esquema de la toma de muestras de heces.

En los días 22 y 42 se pesaron los animales; éstos al ser manipulados se estresan y defecan, lo que permitió obtener muestras de heces frescas y limpias (sin restos de cama ni alimento). Las heces se recolectaron según los procedimientos indicados por el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de FAVET, obteniendo muestras de la mayor cantidad posible de aves, con las cuales se hizo un *pool* de heces común por cada grupo, que fueron almacenadas en bolsas plásticas estériles, desde las cuales se tomaron muestras de 10 g en triplicado para el análisis de microflora saprófita. Para el análisis de la microflora patógena las muestras fueron tomadas con tómulas medio Clary Blair en triplicado, según los procedimientos indicados por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET.

Enumeración de poblaciones bacterianas saprófitas

La enumeración de poblaciones bacterianas saprófitas se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de FAVET, por procedimientos convencionales de microbiología que se describen en la Tabla 2. Se cuantificaron las siguientes poblaciones bacterianas: Recuento de aeróbios mesófilos (RAM), enterobacterias (EB), coliformes totales (CT) y anaerobios totales (AT). Los resultados fueron expresados como log₁₀ UFC/g de muestra.

Tabla 2. Protocolo para el aislamiento e identificación de organismos saprófitos.

M.O.*	Agar	Ambiente	T°	Incubación	Método de cuantificación
R.A.M.	P.C.A. ¹	Aerobio	35 °C	48 hr	Recuento en placa
Enterobacterias	V.R.B.G. ²	Microanaerobiosis	35 °C	24 hr	Recuento en placa
Coliformes totales	V.R.B. ³	Microanaerobiosis	35 °C	24 hr	Recuento en placa
Anaerobios totales	P.C.A. ¹	Anaerobio	35 °C	48 hr	Recuento en placa

*M.O: Microorganismos. ¹ Plate Count Agar. ² Violet Red Bile with Glucose. ³ Violet Red Bile.

Enumeración de poblaciones bacterianas patógenas

La enumeración de poblaciones bacterianas patógenas se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET, por procedimientos convencionales de microbiología que se describen en la Tabla 3. Se cuantificó *Salmonella enterica* y *E. coli* enteropatógena. Los resultados fueron expresados como log UFC/g de muestra.

Tabla 3. Protocolo para el aislamiento e identificación de organismos patógenos.

M.O*.	Agar	Ambiente	T°	Incubación	Tinción
<i>Salmonella enterica</i>	A.P.T. ¹ - Semosólido	Anaerobio	37 – 41,5 °C	24 – 24/48 hr	Cristal Violeta G (-)
<i>E. coli</i> enteropatógena	A.P.T. ¹ - Maconkey	Aerobio	37 °C	18 – 24 hr	Cristal Violeta G (-)

*M.O: Microorganismos. El proceso de cultivo se divide en dos etapas. Se indica separadas de un guión las 2 fases.¹ All Purpose Tween.

Análisis Estadístico

Los datos de enumeración de poblaciones bacterianas fueron transformados a log10, luego se calculó promedio \pm desviación estándar. Se aplicó una prueba de normalidad de Shapiro Wilk y como los datos se encontraron distribuidos de manera normal, se utilizó una prueba de ANDEVA y de Tukey ($p < 0,05$) con el software Statistix 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RAM probióticos

En la Figura 2, se presenta la cuantificación de RAM en \log_{10} UFC/g en función del tiempo de uso del probiótico durante todo el período de cría de los pollos Broiler. En la documentación del probiótico se definía que contenía una cantidad de microorganismos de $6,8 \log_{10}$ UFC/mL (al momento de la preparación), la cual fue superior a los $4,8 \pm 0,02 \log_{10}$ UFC/mL observados al día 22. Esta cantidad disminuyó significativamente en la medición del día 42 obteniendo un RAM de $3,8 \pm 0,03 \log_{10}$ UFC/mL.

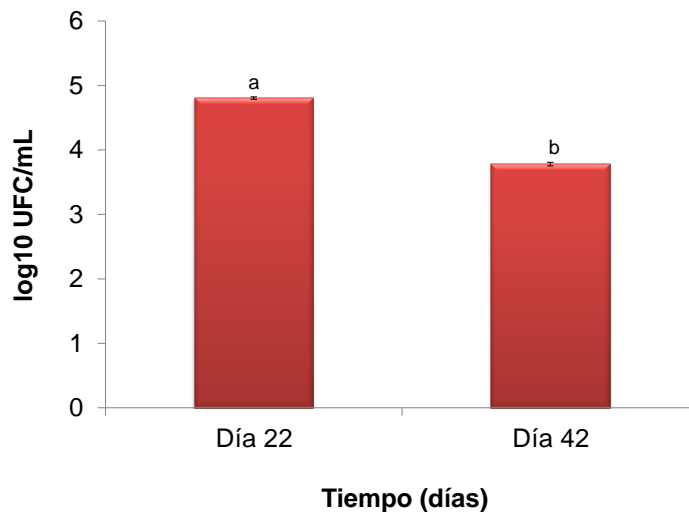


Figura 2. Recuento de aeróbios mesófilos en el probiótico durante la duración del estudio (42 días). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La disminución del recuento de RAM que se observó en la medida que avanzó el período de cría se puede explicar debido a que el bidón plástico que contenía los probióticos llegó a la granja experimental el día 1, al comienzo del estudio, cuando las aves tenían 1 día de edad. Este estuvo almacenado en las condiciones de la unidad experimental (con

temperaturas altas entre 25 a 37°C durante los meses de diciembre-enero), durante 42 días y sin adición de nuevo sustrato para las bacterias.

Las bacterias presentan distintas vías metabólicas para obtener energía como lo son la fermentación y la respiración celular (Madigan *et al.*, 2003). Posiblemente, la disminución sostenida en el tiempo del recuento de RAM se debió a que durante todo el tiempo de almacenamiento de los probióticos al no haber un recambio del sustrato alimenticio de las bacterias, generando un agotamiento de las poblaciones bacterianas; ya que se requiere, de una base de carbono y nitrógeno como elementos base, además de otros macro y micronutrientes como el hierro, potasio y el manganeso para su mantención en el tiempo y viabilidad (Madigan *et al.*, 2003). Por ejemplo, *Bacillus subtilis* utiliza glucosa o glicerol como fuente de energía (Beranová *et al.*, 2008). En el caso de las bifidobacterias, éstas utilizan variados tipos de oligosacáridos (como los galacto-oligosacáridos o los manano-oligosacáridos) como base de su alimentación; degradándolos a monosacáridos que se utilizarán como intermediarios en el proceso de la fermentación de la glucosa, obteniéndose ATP, lactato y acetato (Pokusaeva *et al.*, 2011). Las BAL, que incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (entre otros), utilizan azúcares para generar ácido láctico; principalmente, lactosa, la cual hidrolizan a monómeros para su utilización (Fox, 2011). Por lo tanto, al no tener sustrato para activar sus vías metabólicas, las células no pueden producir los nutrientes necesarios para su subsistencia (Madigan *et al.*, 2003) y, como se pudo observar en el presente estudio, la consecuencia de esto fue la disminución de su población en el conteo los días 22 y 42 de estudio.

Otro factor que puede haber generado la disminución de algunas de las cepas probióticas, son las altas temperaturas que se alcanzaron en el ambiente en donde se encontraba el bidón que contenía los microorganismos, cercano a los 37°C en la unidad experimental. Sin embargo, varias de las especies utilizadas en la formulación del probiótico están presentes en la microflora normal de los pollos, cuya temperatura corporal normal es de $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Prinzinger *et al.*, 1991), por lo que no se esperaría una alteración de la sobrevivencia de éstas dado por el factor de la temperatura ambiental. Además, las temperaturas óptimas para el correcto desarrollo de estos microorganismos son variables, oscilando entre los 25 a 45°C

para *Bifidobacterium* spp. (Shah, 2011), 40°C para *Bacillus subtilis* (Beranová *et al.*, 2008), 30 a 45°C para las BAL (Fox, 2011), 30°C para *Rhodopseudomonas palustris* (Carlozzi y Sacchi, 2001; Kim y Lee, 2000; Kuo *et al.*, 2012) y 32°C para *Saccharomyces cerevisiae* (Tronchoni *et al.*, 2012); por tanto sólo 2 de las especies de la formulación de probióticos utilizada (*Rhodopseudomonas palustris* y *Saccharomyces cerevisiae*) podrían haberse afectado por las altas temperaturas. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, ésta es una levadura (Rezaei *et al.*, 2014), por lo que para cuantificarla se debe usar el protocolo de recuento de mohos y levaduras en alimentos (Norma ISO 7954) que no fue utilizado en este estudio.

Otro factor que puede haber influenciado la sobrevivencia de las cepas probióticas podrían haber sido las fluctuaciones de gases O₂ y CO₂ en el interior del recipiente contenía los probióticos, ya que este permaneció cerrado con una tapa plástica durante todo el período experimental, y sólo se abría alrededor de 10 min diariamente cuando se extraía la dosis del probiótico, por recomendación del proveedor. El género *Bifidobacterium* es reconocido por ser anaerobio, pero en este probiótico se utilizaron las especies más tolerantes al oxígeno (Andriantsoanirina *et al.*, 2013). Todas las especies utilizadas en esta mezcla probiótica tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con oxígeno, pero dada la naturaleza de anaerobios de algunos géneros (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) sería recomendable que el envase permaneciera sellado. Cabe agregar que el envase en este estudio se mantuvo por 42 días en el galpón de crianza, ya que en este estudio se utilizó una cantidad reducida de aves. Pero en su utilización comercial real debería durar unos 2 a 3 días y luego debiese ser reemplazado por uno nuevo, pudiendo evitarse problemas asociados a la baja viabilidad de los microorganismos debido al prolongado almacenamiento por efecto del sustrato alimenticio, T° y gases ambientales.

Efecto de los probióticos sobre bacterias saprófitas

Primer control: Día 22

En la Figura 3 se presenta la cuantificación de las distintas poblaciones de microorganismos saprófitos en log₁₀ UFC/g. El RAM del grupo control fue de $7,8 \pm 1,0$ log₁₀ UFC/mL, en tanto que para los grupos T1 y T2 fue de $7,8 \pm 1,0$ y $7,8 \pm 1,0$ log₁₀ UFC/mL respectivamente, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el caso de las enterobacterias, el escenario fue distinto, ya que para el grupo control el conteo fue de $7,9 \pm 1,2$ log₁₀ UFC/mL, siendo significativamente superior a los $5,6 \pm 1,1$ log₁₀ UFC/mL del grupo T1, y más del doble del grupo T2 ($3,9 \pm 0,4$ log₁₀ UFC/mL) ($p > 0,05$). Para los coliformes totales, el conteo fue de $7,4 \pm 1,2$ log₁₀ UFC/mL en el grupo control; $7,8 \pm 1,0$ log₁₀ UFC/mL para T1 y $5,1 \pm 0,6$ log₁₀ UFC/mL en T2. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo T2 y los otros 2 grupos. Sin embargo, entre los grupos control y T1 no hubo diferencias ($p > 0,05$). Finalmente, los microorganismos anaerobios presentaron un promedio de $7,3 \pm 1,1$ log₁₀ UFC/mL para el grupo control, el cual mostró una cantidad significativamente mayor de bacterias que T1 ($4,9 \pm 0,5$ log₁₀ UFC/mL) y T2 ($4,5 \pm 0,1$ log₁₀ UFC/mL).

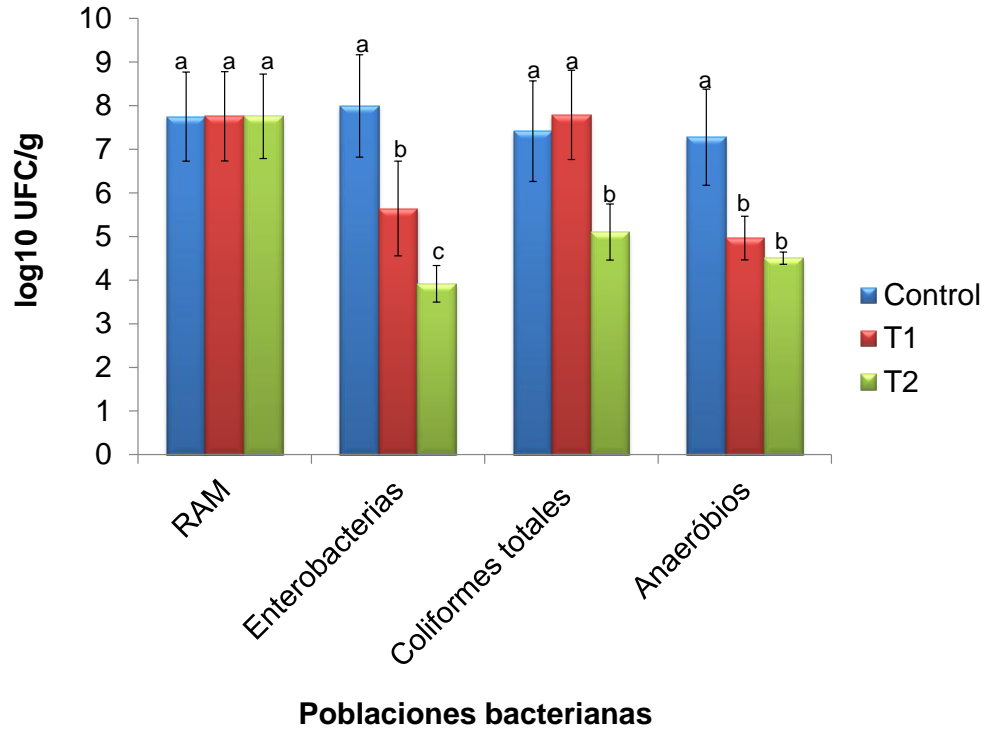


Figura 3. Cuantificación de diferentes poblaciones bacterianas saprófitas obtenidas desde heces de pollos broiler al día 22 de vida. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y dentro de cada grupo bacteriano ($p < 0,05$).

Se observó que ambas dosis de probióticos alteraron las poblaciones microbianas en el intestino de los animales. El tratamiento 1 no tuvo un efecto supresor tan notorio como el tratamiento 2 en las poblaciones de enterobacterias. Para el caso de los coliformes totales fue necesaria la dosis más alta para ejercer una disminución de esta población. Para el caso de anaerobios la dosis de probiótico no tuvo un efecto significativo sobre este grupo.

Segundo control: Día 42

En la Figura 4 se presenta la cuantificación de las distintas poblaciones de microorganismos saprófitos en log₁₀ UFC/g al día 42. A modo general se observa que el número de microorganismos aumentó en todas las poblaciones en comparación al día 22. En el caso del RAM, el grupo control tuvo un conteo de $10,8 \pm 0,1$ log₁₀ UFC/mL, para T1 fue de $10,7 \pm 0,2$ log₁₀ UFC/mL y para T2 de $10,5 \pm 0,4$ log₁₀ UFC/mL, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos. El conteo de las enterobacterias correspondió a $9,5 \pm 2,3$ log₁₀ UFC/mL para el grupo control, $9,4 \pm 2,3$ log₁₀ UFC/mL para el grupo T1 y $9,2 \pm 2,2$ log₁₀ UFC/mL para el grupo T2, y tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento. Los coliformes totales, en tanto, fueron $8,1 \pm 2,4$ log₁₀ UFC/mL para el grupo control, $8,0 \pm 2,2$ log₁₀ UFC/mL para el T1 y $8,0 \pm 2,4$ log₁₀ UFC/mL para T2, y no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento. Finalmente, a diferencia de todos los grupos de microorganismos mencionados anteriores, en el caso de los anaerobios si se observaron diferencias estadísticamente significativas ya que el grupo control con $9,4 \pm 0,7$ log₁₀ UFC/mL, que fueron significativamente superiores a los $6,0 \pm 0,6$ log₁₀ UFC/mL del grupo T1 y a los $6,0 \pm 0,5$ log₁₀ UFC/mL del grupo T2.

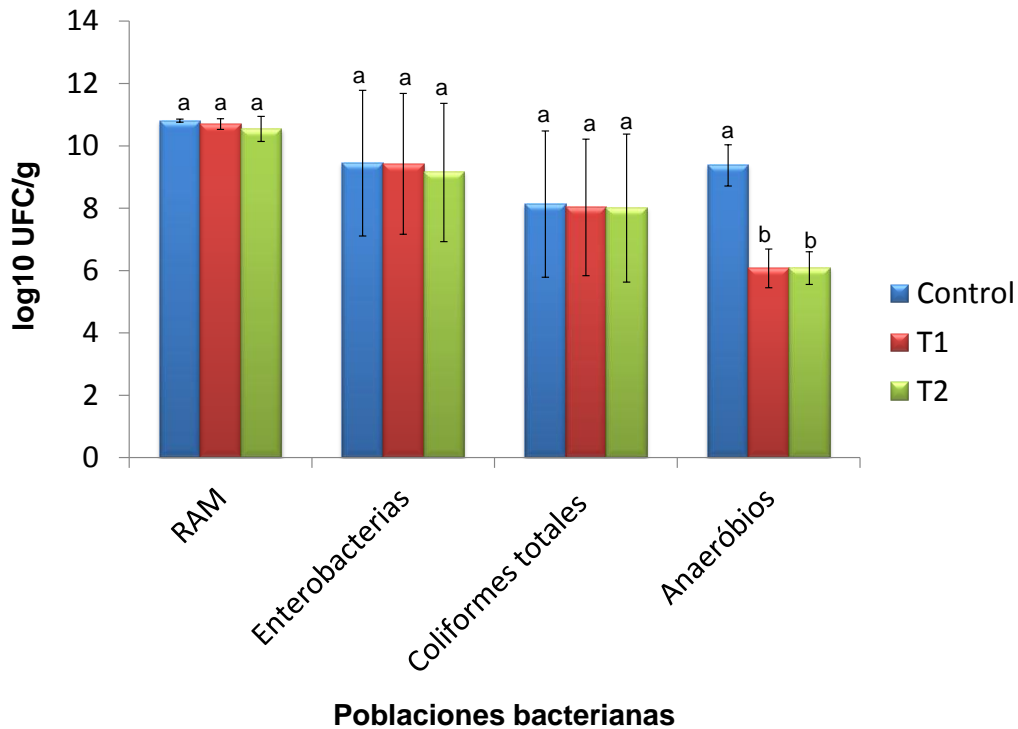


Figura 4. Cuantificación de diferentes poblaciones bacterianas saprófitas obtenidas desde heces de pollos broiler al día 42 de vida. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y dentro de grupo bacteriano ($p < 0,05$).

Como se puede apreciar en la Figura 4, el efecto dosis ya no fue tan marcado como en el día 22, e incluso para el único grupo de microorganismos, que el uso de probióticos mantiene su efecto supresor de las bacterias anaeróbicas, en donde no se observó un efecto de las dosis.

Las aves nacen sin una flora intestinal establecida y tienen un sistema inmune no desarrollado, lo que las hace propensas a la colonización de microorganismos patógenos y saprofitos en las primeras horas de sus vidas (La Regione *et al.*, 2001; La Regione *et al.*, 2005). Se ha descrito que la colonización inicial es de suma importancia, ya que desarrolla los patrones de expresión genética en las células epiteliales, para proveer un hábitat favorable para ellas; es por esto que las bacterias pioneras son determinantes para la composición de la flora intestinal normal del animal adulto (Timmerman *et al.*, 2006). Esta

colonización se lleva a cabo generalmente mediante interacciones del tipo receptor – adhesina, para evitar que las defensas del organismo hospedero, como la descamación o movimientos peristálticos las eliminen (La Regione *et al.*, 2005). La administración temprana de probióticos modifica la composición de la flora intestinal del animal como se demuestra en los trabajos de Timmerman *et al.* (2006) y La Regione *et al.* (2001), condiciéndose con los resultados obtenidos en este ensayo, ya que las diferencias más notorias en las poblaciones bacterianas de pollos broiler se observaron en los días previos al establecimiento de la flora adulta en el animal, que se produce hasta las 4 semanas de edad. La flora normal de los animales adultos es relativamente estable, pero puede alterarse por varios procesos, como los cambios hormonales, la administración de antibióticos, la radiación y emaciación (La Regione *et al.*, 2005).

En relación al efecto dosis, cabe recordar los mecanismos de acción de los probióticos sobre las demás poblaciones bacterianas; actúan regulando y/o suprimiendo el crecimiento de ciertas especies (Amalaradjou y Bhunia, 2012). En este caso, las diferencias más significativas entre poblaciones se observaron el día 22, siendo el tratamiento 2, con la dosis más alta, el que produjo un mayor efecto supresor sobre enterobacterias, coliformes totales y anaerobios; pero no sobre RAM, lo que podría explicarse por los mecanismos de colonización de las bacterias, ya que al ser más abundante el volumen de éstas que entran al tracto gastro-intestinal, más rápida será la colonización y aclimatación del ambiente a las poblaciones inmigrantes (La Regione *et al.*, 2005).

Al alcanzarse una microflora intestinal adulta, la estabilidad en las poblaciones provoca mayor dificultad en la modificación de la flora bacteriana intestinal, tal como se ve reflejado al observar los resultados obtenidos en el día 42. Además, debe considerarse la baja en el RAM del probiótico cuando los animales ya presentaban una microflora intestinal adulta, disminuyendo aún más su influencia sobre las poblaciones, lo que explica que los grupos control, T1 y T2 al final del estudio mostraran microfloras bacterianas existentes, lo que explica que los grupos control, T1 y T2 al final del estudio mostraran microfloras intestinales sin diferencias importantes en la cuantificación de RAM, enterobacterias y coliformes totales. Otro factor que puede explicar la baja influencia del

probiótico en esta etapa puede ser que la dosis de probiótico no varió en la medida que avanzaba el tiempo del estudio, ya que los pollos broiler aumentan considerablemente de peso de alrededor de 42 a 45 g al nacimiento hasta 2.700 a 3.000 g al día 42 (Aviagen, 2010), por tanto el volumen del tracto intestinal y la masa bacteriana también se incrementan. Por tanto, la dosis debiese establecerse respecto a la etapa de crianza o edad de los pollos broiler.

En el caso específico de los anaerobios, que fue el único grupo bacteriano que disminuyó sus cuentas por efecto de los probióticos al día 42 de estudio. Se podría explicar porque estos microorganismos son más susceptibles a efectos de exclusión competitiva promovida por *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Santini *et al.*, 2010).

Efecto de los probióticos sobre bacterias patógenas.

Con respecto a las poblaciones patógenas que fueron estudiadas, todas las muestras de heces fueron negativas a la presencia de *Salmonella enterica* y *E. coli* enteropatógena. La ausencia de patógenos, se puede explicar por el buen manejo de la unidad experimental, ya que se respetó el vacío sanitario entre estudios (*all in- all out*), precedido de una meticulosa desinfección con DUPLALIM®, el cual es un desinfectante de amplio espectro, de acción germicida sobre bacterias, hongos, y virus, pudiendo atacar tanto a organismos Gram positivos, como Gram negativos y que posee acción directa contra *Salmonella enterica* y *E. coli* enteropatógena. Además, se consideró una densidad adecuada para los animales, donde 33 kg/mt² es lo recomendado para esta especie (Aviagen, 2010). El estrés más notorio al que estuvieron expuestos las aves fue al calórico, ya que las temperaturas de la unidad experimental superaron los 20 – 25°C de temperatura descrita como la zona de termoneutralidad de los pollos broiler (Lin *et al.*, 2006). Éstas altas temperaturas tienen efectos detrimentales en la salud de las aves pudiendo producir alta mortalidad por el aumento de enfermedades infecciosas, disminución del consumo de alimento, bajo peso y mala calidad de la carne (Lin *et al.*, 2006). A pesar de esto, este estrés no se reflejó en la proliferación de los patógenos estudiados. Por último, se mantuvo un adecuado manejo de las camas, sin observarse problemas de camas húmedas durante todo el proceso de crianza,

lo que también pudiese haber repercutido en el adecuado estado sanitario de los animales.

CONCLUSIONES

La inclusión del probiótico en el agua de bebida disminuyó significativamente ciertas poblaciones bacterianas como: enterobacterias, coliformes totales (sólo con la dosis más alta) y anaerobios al día 22 del estudio. Mientras que al día 42, sólo se observó un efecto supresor del probiótico sobre la cuantificación de microorganismos anaerobios.

El efecto-probiótico de disminuir ciertas poblaciones bacterianas se dio principalmente en la etapa en que las aves se encuentran adquiriendo su microflora intestinal (primeras semanas de vida).

El uso de la dosis mayor de 70 mL/20 animales, disminuyó las poblaciones bacterianas de enterobacterias y coliformes totales al día 22, pero no se observó un efecto-dosis en otros grupos bacterianos.

En estudios futuros es necesario mantener un estricto control de los factores que afectan la viabilidad de los probióticos y ajustar la dosis del probiótico a las diferentes etapas de crecimiento de los pollos broiler.

BIBLIOGRAFÍA

- **AMALARADJOU, M.; BHUNIA, A.** 2012. Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 67: 185-239.
- **AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z.** 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Sci.* 83: 1093-1098.
- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M.; ARANZAZU, MARIA.** 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul. Toxicol. Pharm.* 45: 91-95.
- **ANDRIANTSOANIRINA, V.; ALLANO, S.; BUTEL, M.; AIRES, J.** 2013. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe.* 21: 39-42.
- **AOAC.** 1996. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 16ª ed. Gaithersburg, Estados Unidos. v. 1.
- **AVIAGEN.** 2007. Broiler Ross 308: Especificaciones de nutrición. pp 1-24. [en línea]
<http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross-Especificaciones-Nutricin-Broiler-308-2007.pdf> [consulta : 22-05-2014].
- **AVIAGEN.** 2009. Manual del pollo de engorde Ross 308. pp 1-97. [en línea]
<http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/RossManualManejoPolloEngordeRoss-2009.pdf> [consulta : 05-06-2014].
- **AVIAGEN.** 2010. Manual de manejo del pollo de carne Ross. pp 1-104. [en línea]
<http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Manual-del-pollo-Ross.pdf>[consulta : 22-05-2014].
- **BAFFONI, L.; GAGGIA, F.; DI GIOIA, D.; SANTINI, C.; MOGNA, L.; BIAVATI, B.** 2012. A *Bifidobacterium*-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. Jejuni* along the poultry food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 157: 156-161.
- **BERANOVÁ, J.; JEMIOŁA-RZEMIŃSKA, M.; ELHOTTOVÁ, D.;**

- STRZALKA, K.; KONOPÁSEK, I.** 2008. Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778; 445–453.
- **CARLOZZI, P.; SACCHI, A.** 2001. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 88; 239–249.
 - **CUTTING, S.** 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28: 214-220.
 - **DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L.** 2006. Probiotics: From research to consumer. *Digest. Liver Dis.* 38(2): 248-255.
 - **FRANZ, C.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A.** 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151: 125-140.
 - **FOX, P.** 2011. Lactic Acid Bacteria: An Overview. **In:** Fuquay, J.; Fox, P.; McSweeney, P. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2^a ed. Elsevier. Londres, Inglaterra. v.1.
 - **FULLER, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
 - **GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B.** 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141: 15-28.
 - **GIANNENAS, I.; PAPADOPOULOS, E.; TSALIE, E.; TRIANTAFILLOU, E.; HENIKL, S.; TEICHMANN, K.; TONTIS, D.** 2012. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 188: 31-40.
 - **ICMSF.** 2000. Microorganismos indicadores. **In:** Microorganismos de los alimentos: Su significado y métodos de enumeración. 2^a ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España. v. 1.
 - **KABIR, S.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.; AHMED, S.** 2004. The Dynamics of Probiotics on Growth Performance and Immune Response in Broilers. *Int. J. Poultry Sci.* 3(5): 361-364.

- **KIM, J.; LEE, B.** 2000. Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. *Aquacult. Eng.* 23: 281–293.
- **KUO, F.; CHIEN, Y.; CHEN, C.** 2012. Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas palustris*. *Bioresource Technol.* 113; 315–318.
- **LA RAGIONE, R.; CASULA, G.; CUTTING, S.; WOODWARD, M.** 2001. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Vet. Microbiol.* 79: 133-142.
- **LA RAGIONE, R.; NEWELL, D.; WOODWARD, M.** 2005. Bacterial colonization of avian mucosal surfaces. In: Holzapfel, W.; Naughton, P. *Microbial Ecology in Growing Animals*. Elsevier. Londres, Inglaterra. pp. 258-278.
- **LIN, H.; JIAO, H.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.** 2006. Strategies for preventing heat stress in poultry. *World. Poultry Sci. J.* 62: 71-85.
- **LIN, W.; YU, B.; JANG, S.; TSEN, H.** 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe.* 13: 107-113.
- **MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J.** 2003. Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano. In: Brock *Biología de los Microorganismos*. 10^a ed. Pearson Prentice Hall. Illinois, Estados Unidos. pp. 103-107.
- **REZAEI, M.; DORNEZ, E.; JACOBS, P.; PARSI, A.; VERSTREPEN, K.; COURTIN, C.** 2014. Harvesting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation. *Food Microbiol.* 39: 108-115.
- **NRC.** 1994. *Nutrient Requirement of Poultry*. 9^a ed. Washington, Estados Unidos. Pp. 19-34.
- **PRINZINGER, R.; PREßMAR, A.; SCHLEUCHER, E.** 1991. Body temperature in birds. (Abstract). *Comp. Biochem. Phys. A.* 99(4): 499.
- **POKUSAIEVA, K.; FITZGERALD, G.; VAN SINDEREN, D.** 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 6(3): 285–306.
- **SANTINI, C.; BAFFONI, L.; GAGGIA, F.; GRANATA, M.; GASBARRI, R.; DI GIOIA, D.; BIAVATI, B.** 2010. Characterization of probiotic strains: An

application as feed additives in poultry against *Campylobacter yeyuni*. Int. J. Food Microbiol. 141: S98-S108.

- **SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V.** 2011. Probiotics: A review. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 1(2): 287-290.
- **SHAH, N.** 2011. *Bifidobacterium* spp.: Morphology and Physiology. **In:** Fuquay, J.; Fox, P.; McSweeney, P. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2^a ed. Elsevier. Londres, Inglaterra. v.1.
- **TELLEZ, G.; PIXLEY, C.; WOLFENDEN, R.; LAYTON, S.; HARGIS, B.** 2012. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. Food Res. Int. 45: 628-633.
- **TIMMERMAN, H.; VELDMAN, A.; VAN DEN ELSEN, E.; ROMBOUTS, F.; BEYNEN, A.** 2006. Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented with Chicken-Specific Probiotics. Poultry Sci. 85: 1383–1388.
- **TRONCHONI, J.; ROZÈS, N.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J.** 2012. Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature. Int. J. Food Microbiol. 155; 191–198.
- **YU, B.; LIU, J.; HSIAO, F.; CHIOU, P.** 2008. Evaluation of *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain expressing heterologous β -glucanase as a probiotic in poultry diets based on barley. Anim. Feed Sci. Tech. 141: 82-91.