

## **SIMPOSIO NO. 1 CIENCIA Y TÉCNICA**

### **TEMA: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE UN BIOPREPARADO A BASE DE *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* EN POLLOS DE CEBA**

**AUTORES: FÁTIMA ARTEAGA CHÁVEZ, PEDRO CHÁVEZ MANTILLA, MARTA LAURENCIO SILVA, MARIO LÓPEZ VERA, PATRICIO VÉLEZ VERA, ANA JULIA RONDÓN CASTILLO, GRETHEL MILIÁN FLORIDO Y MANUEL PÉREZ QUINTANA.**

La avicultura moderna, se caracteriza por la explotación intensiva de la producción, la misma no está exenta de diversos factores causantes de desequilibrios de la microflora intestinal en los animales. Factores tales como la alta densidad de población, los programas de vacunación inadecuados, las altas o bajas temperaturas, la fluctuación en los valores de humedad, la incidencia de gases tóxicos, la alta carga de microorganismos patógenos, la variabilidad de los concentrados y la inmunodepresión, son algunas de las problemáticas causantes de altos niveles de estrés en las aves.

En el Ecuador, la producción Avícola se ve afectada con mucha frecuencia por enfermedades gastrointestinales. El tracto gastrointestinal de los pollos constituye el órgano que con mayor frecuencia es atacado por agentes patógenos, los cuales provocan patologías severas que afectan a las aves de todas las edades, aparejado con esto los altos porcentajes de mortalidad, lo que se traduce en un bajo incremento de peso de los animales que sobreviven y una disminución en los rendimientos productivos y por ende en los económicos.

Cada vez es mayor el uso de probióticos en la avicultura, en general, la razón de esto hay que buscarla en el amplio abanico que ofrece su uso. Los probióticos son biopreparados de origen natural, seguros, generalmente estable, no producen efectos acumulativos y las cepas que se utilizan para su elaboración provienen del tracto intestinal de la misma especie animal para los cuales van a ser usadas (Serrano *et al.*, 2000).

Para solucionar esta problemática es posible el uso de probióticos a base de bacterias ácido lácticas. Entre los de mayor interés se encuentran *Lactobacillus*

spp. aislados del ambiente intestinal de aves, ampliamente utilizados en la elaboración de estos productos. La adherencia "*in vivo*" de la supervivencia a través del tracto gastrointestinal es más fácil de lograr. De ahí que el éxito de un probiótico dependa en gran medida de realizar una buena selección de cepas que posean la capacidad de sobrevivir y adherirse a la mucosa intestinal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad probiótica de un biopreparado a base de *Lactobacillus salivarius*, aislados de pollos de ceba, sobre indicadores inmunológicos, microbiológicos y productivos en pollos de ceba.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Elaboración del Biopreparado.** Se obtuvo a partir del crecimiento de un cultivo de *Lactobacillus salivarius* en un medio estandarizado informado por Rondón (2009).

**Procedimiento Experimental.** Se utilizaron 400 pollos de ceba del híbrido comercial ROSS 308 de un día de edad distribuidas en cuatro grupos experimentales de 100 aves cada uno, según diseño completamente aleatorizado. Se hicieron cuatro repeticiones de 25 animales por tratamientos. Los tratamientos utilizados fueron: T1 (control sin biopreparado); T2, T3 y T4 con 0,5; 1,0 y 1,5 mL/ L de agua, respectivamente.

El experimento se desarrolló en el Barrio "San Lorenzo" de la ciudad de Calceta Cantón Bolívar, donde se evaluó el biopreparado. La crianza fue en jaula. El sistema de alimentación fue *ad libitum*, con un concentrado de inicio de 0 a 28 días, y otro de finalización de 29 a 45 días. Los mismos estaban basados en una dieta de maíz-soya, según los requerimientos del NRC (1994).

Las aves se sometieron a las mismas condiciones experimentales durante el ciclo de vida de 42 días con tres momentos de muestreo (28, 35 y 42 días).

### **Esquema de vacunación**

Se siguió el esquema de vacunación siguiente: el primer día de edad Marek, Viruela aviar, Bronquitis infecciosa, primera dosis de Gumboro. A los siete días la segunda dosis de Gumboro. A los 14 días Newcastle y a los 21 la tercera dosis de Gumboro.

### **Procedimiento experimental para el análisis de las muestras.**

Para determinar *in vivo* el efecto probiótico se seleccionaron y sacrificaron de diez solo 4 animales por tratamiento en cada muestreo. La selección se realizó sobre la base del peso promedio de cada grupo de aves, en un rango de  $\pm 10$  %. El procedimiento para evaluar la actividad biológica del biopreparado se describe a continuación:

### **Indicadores microbiológicos**

**Toma de muestras:** A los 28, 35 y 42 días se tomaron muestras del contenido cecal (1 g) de 4 pollos por tratamiento. Las mismas se homogenizaron en 9 mL de agua de peptona para *Lactobacillus* y en solución salina estéril (SSE) para los demás grupos microbianos.

**Medios selectivos:** Para realizar el conteo de los diferentes grupos microbianos en los ciegos de los pollos, se emplearon diferentes medios selectivos. En el caso de los anaerobios totales se utilizó Agar nutriente (MERCK); coliformes Agar Macconkey (MERCK); *Lactobacillus* Agar MRS (MERCK); *Bacillus* spp. Agar Nutriente (MERCK).

Para efectuar el conteo de los diferentes grupos microbianos se realizaron diluciones seriadas de las muestras del contenido cecal de los pollos, en una relación de 1:10 (v/v), en agua de peptona para los *Lactobacillus* y en SSE para los demás grupos microbianos. Para coliformes se hicieron diluciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , para los grupos de *Bacillus* y anaerobios totales las diluciones fueron desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$ , para *Lactobacillus* spp desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-11}$ .

### **Indicadores inmunológicos**

Para evaluar la respuesta de la bolsa de Fabricio se procedió según metodología de Giambone 1996.

### **Indicadores productivos**

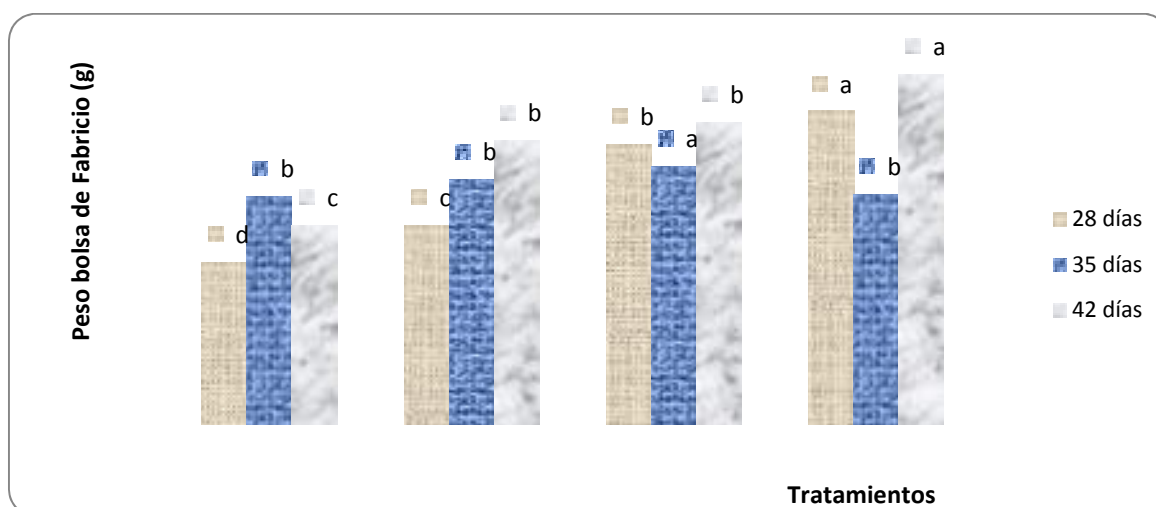
En el experimento se evaluaron algunos indicadores productivos, entre ellos, el peso vivo (PV), y la conversión alimenticia que se controlaron a los 21, 35 y 42 días. Estos indicadores se calcularon como se describe en el Instructivo Técnico para el pollo de ceba (UCAN- IIA, 1998).

### **Procesamiento estadístico**

Para el análisis de los datos se utilizó el sistema Stargraph versión 5,0. Los análisis de varianza se realizaron para verificar diferencias significativas entre las medias, con un nivel de significación de  $P < 0,05$ . La prueba de Duncan (1955) se usó para realizar las comparaciones múltiples entre las medias. Los conteos de microorganismos viables se transformaron a Log N, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis, se aplicó la fórmula  $(K+N) \cdot 10^x$ , donde K es la constante que representa el logaritmo de la dilución en la cual se inoculó el microorganismo; N es el logaritmo del número de UFC determinado; 10 es la base de los logaritmos y X es la dilución a la cual se efectuó la inoculación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la dinámica del peso de la bolsa de Fabricio cuando se aplicó el biopreparado. En los resultados obtenidos se observa un incremento de peso ( $P < 0,01$ ) en los animales tratados y momentos de muestreo, con los mayores pesos en el tratamiento T3 a los 35 y 42 días.



a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para  $P < 0.05$  (Duncan, 1955),  $P < 0,01$   
 $ES \pm 0,22$

**Figura 1.** Dinámica del peso de la bolsa de Fabricio ante la aplicación de un biopreparado con *Lactobacillus* spp. en pollos de engorde.

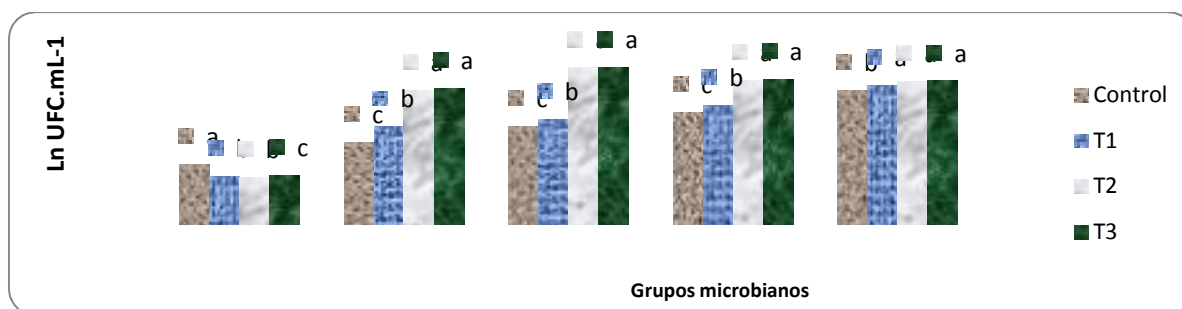
El sistema inmune de las aves sufre cambios significativos, los cuales aparecen en las diferentes etapas de desarrollo. Según Giambrore (1996) y Contreras y Fernández (1999), en la primera etapa de la vida, la bolsa y el timo se presentan como los órganos centrales de la inmunidad. La primera produce los linfocitos B, que se encargan de la inmunidad humoral (producción de

anticuerpos) y el segundo, genera la inmunidad mediada por células (producción de citoquinas y células por linfocitos T). El sistema inmune de las aves lo constituyen el bazo, el timo, las tonsilas cecales, las glándulas de Harder y la médula ósea. Éstos son poblados durante el crecimiento por los linfocitos B y T, y cuando los animales se acercan o alcanzan la madurez sexual, la bolsa y el timo involucionan y la respuesta inmune pasa a depender del sistema periférico.

La bolsa desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune en los animales (Rondón 2009). Los incrementos de peso en este órgano coincide con los informados por Saloff-Coste (1994) con el empleo de *Lactobacillus* spp. en pollos de ceba. Similares resultados coincidentes con los reportados por Hamid *et al.* (2005) con el uso de cultivos de *Lactobacillus* spp en broilers.

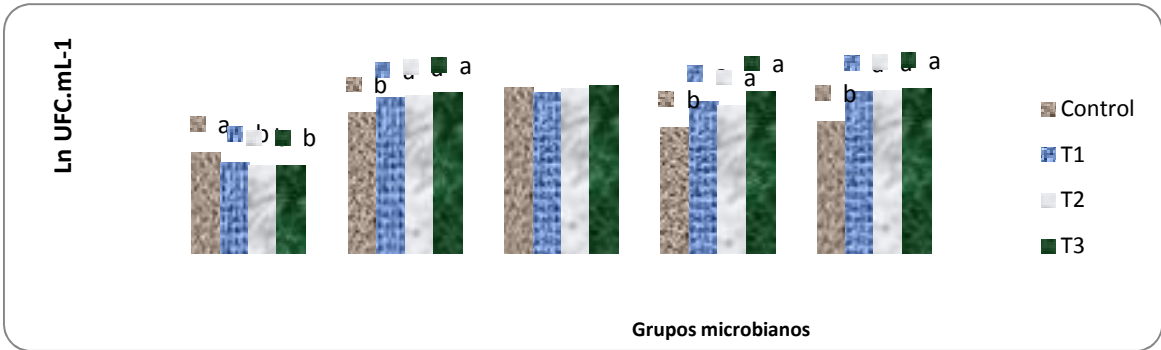
Los conteos microbianos en los ciegos, con los diferentes tratamientos y momentos de muestreos, se muestra en las figuras 2, 3 y 4. Hay una disminución en el conteo de coliformes totales ( $P < 0,01$ ) en los animales con *L. salivarius* e incrementos en el número de *Bacillus* spp, totales aeróbicos, *Lactobacillus* spp y totales anaeróbicos en estos animales.

La disminución en el conteo de coliformes totales en los animales con *L. salivarius* y los incrementos en el número de *Bacillus* spp, totales aeróbicos, *Lactobacillus* spp y totales anaeróbicos en estos animales demuestran la acción del biopreparado probiótico empleado. Estos resultados coinciden con los reportados por Stern *et al.* (2006) quienes comprobaron la inhibición de *Campylobacter jejuni* por *Lactobacillus salivarius* en pollos de ceba.



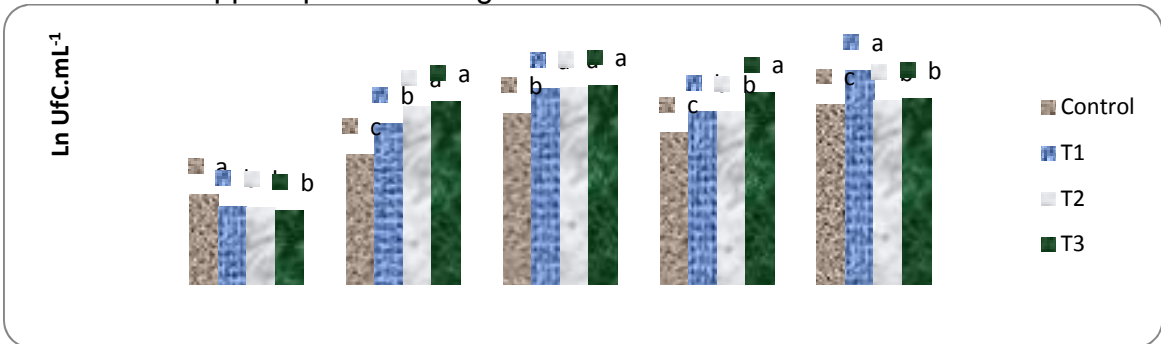
a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para  $P < 0.05$  (1955),  $P < 0,01$   
 $ES \pm 1,65$

**Figura 2.** Conteos microbianos ante la aplicación de un biopreparado con *Lactobacillus* spp en pollos de engorde a los 28 días de edad.



a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para  $P < 0.05$  (Duncan, 1955).  $P < 0,01$   $ES \pm 1,76$

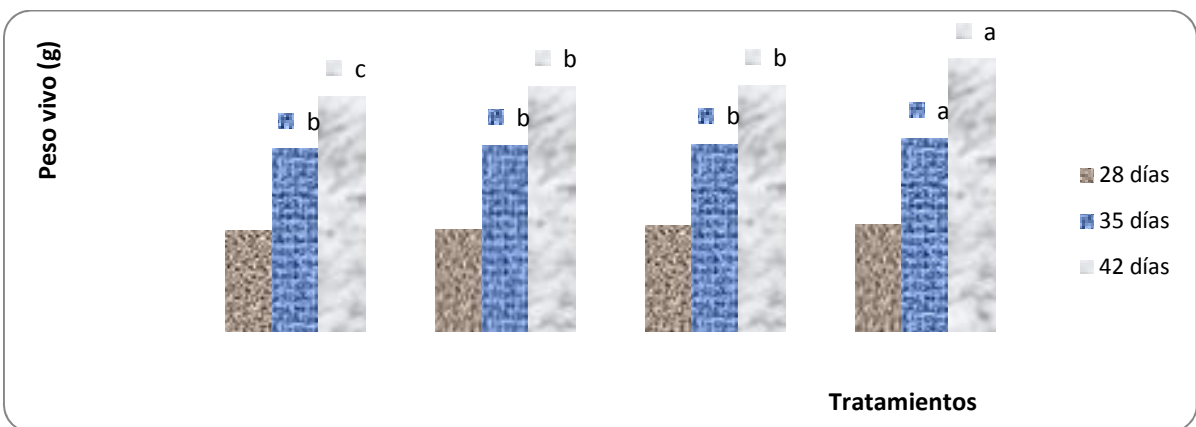
**Figura 3.** Conteos microbianos ante la aplicación de un biopreparado con *Lactobacillus* spp en pollos de engorde a los 35 días de edad.



a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para  $P < 0.05$  (Duncan, 1955),  $P < 0,01$   $ES \pm 1,41$

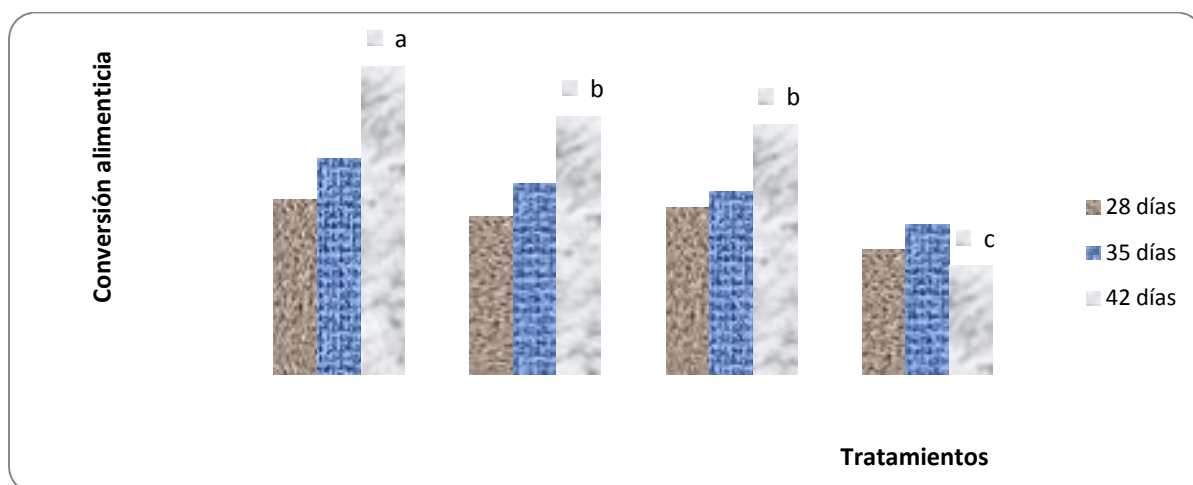
**Figura 4.** Conteos microbianos ante la aplicación de un biopreparado con *Lactobacillus* spp en pollos de ceba a los 42 días de edad.

Las figura 5 y 6 muestran la dinámica del peso del peso vivo y la conversión alimenticia ante la aplicación del biopreparado en pollos de engorde. Se produjo un incremento en el peso vivo ( $P < 0,01$ ) en todos los animales tratados con los mayores peso en el tratamiento T3 a los 28, 35 y 42 días de edad.



a,b,c,d Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para  $P < 0.05$  (Duncan, 1955),  $P < 0,01$   $ES \pm 13,61$

**Figura 5.** Dinámica del peso vivo ante la aplicación de un biopreparado con *Lactobacillus* spp. en pollos de ceba.



a,b,c Letras diferentes entre tratamientos en cada momento de muestreo difieren para  $P < 0.05$  (ANOVA,  $P < 0.01$ ),  $ES \pm 0.40$

**Figura 6.** Dinámica de la conversión alimenticia ante la aplicación de un biopreparado con *Lactobacillus* spp. en pollos de ceba.

El incremento en el peso vivo y la mejora en la conversión alimenticia, en los animales tratados con el biopreparado en todas las edades, se relacionan con los efectos beneficiosos sobre los indicadores inmunológicos y microbiológicos en el tracto digestivo, expuestos anteriormente. Estos resultados coinciden con los encontrados por Rondón (2009) quien utilizó una cepa de *Lactobacillus salivarius* en Broilers. Igualmente, Samaniego *et al.* 2007 utilizaron una mezcla de bacterias lácticas en broilers y alcanzaron un mayor peso vivo y una mejor conversión alimenticia en los animales tratados.

Para determinar el efecto probiótico de los biopreparados en pollos se tuvo en cuenta la experiencia acumulada en trabajos desarrollados en Cuba por Pérez (2000), Piad (2001) y Bocourt *et al.* (2007), con el propósito de realizar una evaluación integral de los principales indicadores demostrativos de la actividad probiótica de los biopreparados en los animales.

Algunos investigadores evaluaron cepas de *Lactobacillus salivarius* procedentes del TGI de las aves (Garriga *et al.* 1998, Pascual *et al.* 1999 y Audicio y Apella 2006), fundamentalmente por mostrar éstas una fuerte actividad antimicrobiana frente a patógenos; sin embargo, son pocos los

estudios que refieren el efecto de la inclusión de esta especie en la dieta de las aves en otros indicadores de actividad probiótica.

Los cultivos de *Lactobacillus salivarius*, al mejorar los patrones fermentativos del ciego, redujeron los niveles de coliformes de la población microbiana intestinal y como resultado colateral, debieron reducir los efectos tóxicos de los enteropatógenos sobre la mucosa. Se conoce que los lactobacilos y otras bacterias beneficiosas contribuyen a mantener la integridad de la mucosa intestinal debido a la reducción de los niveles de ureasa, con una correspondiente disminución de los niveles de amoníaco en el TGI, lo que condiciona un buen estado físico de la mucosa intestinal (Bradley *et al.* 1994 y Urrutia 1997). De acuerdo con estas observaciones, se pudiera explicar por qué algunos indicadores morfométricos del tracto gastrointestinal (TGI) como el peso relativo del intestino (vacío), presentaron valores más bajos con respecto al grupo control.

Si se provee a los animales de cepas autóctonas del TGI mediante el uso de probióticos desde las primeras horas de su nacimiento, estas bacterias colonizarán la mucosa intestinal y la protegerán de forma natural contra el crecimiento de otros microorganismos, especialmente de aquellos que son dañinos o indeseables (Fuller 1989).

La actividad probiótica que desarrollaron los cultivos de *Lactobacillus salivarius* en los indicadores productivos, debe analizarse bajo la perspectiva de reconocer la influencia que ejercen estos microorganismos en la fisiología digestiva de los animales. El establecimiento de la *eubiosis* del ecosistema con mejores patrones fermentativos y microbiológicos en el TGI, la estimulación del estado inmune de las aves a través de una respuesta humoral más elevada y un mayor tamaño de los órganos linfoides, son solamente algunas de las razones que condujeron a que las aves expresaran un incremento de peso superior, con una mejor composición corporal y madurez fisiológica. Esto concuerda con Gunther (1995) y Gil de los Santos y Gil-Turnes (2005) quienes refirieron que los probióticos, al estabilizar el sistema microbiológico en el tracto digestivo, mejoran la digestibilidad de los nutrientes y proporcionan un rango de



absorción más alto al introducir un anabolismo que promueve la ganancia de peso corporal, con la disminución de la conversión alimenticia.

Se demostró que los cultivos de *Lactobacillus salivarius*, que se incluyeron en una dieta libre de antimicrobianos, influyeron de forma positiva en el desarrollo productivo de los animales.

## CONCLUSIONES

Con el empleo de un cultivo de *Lactobacillus salivarius* con efecto probiótico en pollos de engorde, con un ciclo de crianza de 42 días, se obtuvieron mejoras en indicadores inmunológicos, microbiológicos y productivos.

## REFERENCIAS

- Bradley, G.L., Timm, T.F. & Karen, I. 1994. The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* on male poultry performance. *Poult. Sci.* 73:1766-177
- Contreras, M. & Fernández, J.F. 1999. Entidades inmunosupresoras y su correlación con otras condiciones patológicas y de la crianza. *Industria Avícola*. Marzo:29-34
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66 (5):365-378
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. & Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.* 84:125-132
- Garrity G.M., Bell J.A. y Lilburn T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Release 5. p.190-195. <<http://141.150.157.80/bergeysoutline>>.
- Giambrone, J. 1996. Inmunosupresión en las aves: Causas y prevención. *Avicultura Profesional* 14 (5):42-45
- Gunther, K. 1995. The role of probiotics as feed additives in animal nutrition. Department of Animal Physiology and Animal Nutrition. Gottingen, Germany
- Hamid R. Haghghi, Jianhua Gong, Carlton L. Gyles, M. Anthony Hayes, Babak Sanei, Payvand Parvizi, Haris Gisavi, James R. Chambers, and Shayan Sharif. 2005. Modulation of Antibody-Mediated Immune Response by Probiotics in Chickens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12 (12): 1387–1392.

- Kandler O. y Weiss N. 1986. Genus *Lactobacillus*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams & Wilkins (eds.), Baltimore, p. 1208-1234.
- Pérez, M., Piad, R., Laurencio, M., Milián, G., Bocourt, R., Savón, L. & Amigo, S. 2002. Evaluación de la actividad probiótica de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* en pollos de ceba. I. Indicadores fisiológicos, fermentativos y microbiológicos en el tracto gastrointestinal. Rev. Cubana de Ciencia Avícola 26:37-45
- Rondón 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal, Cuba.
- Saloff-Coste, C. 1994. Fermented milks: effects on the immune system. *Danone World Newsletter*. 9, 2-8.
- Samaniego Fernández, L. M., M. Laurencio, M. Pérez, G. Milián, A. Rondón. 2007. Actividad probiótica de una mezcla de exclusión competitiva sobre indicadores productivos en pollos de ceba. Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria. 5 (5): 360-367
- Stern N., Svetoch E., Eruslanov B., Perelygin V., Mitsevich E., Mitsevich I., Pokhilenko V., Levchuk V., Svetoch O., Seal B. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and Purification of Its Bacteriocin, Which Is Inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the Chicken Gastrointestinal System. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50 (9): 3111–3116.