



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efecto de la adición de compuestos antimicrobianos en la dieta sobre la microbiota y parámetros intestinales (íleon) en pollos de engorde**

**Carlos Abel Maya Ortega**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal.  
Medellín, Colombia  
2020

# **Efecto en la adición de compuestos antimicrobianos en la dieta sobre la microbiota y parámetros intestinales (íleon) en pollos de engorde**

**Carlos Abel Maya Ortega**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Agrarias**

Director (a):

PhD., Jaime Eduardo Parra Suescún.

Codirector (a):

PhD (c)., Tomás Antonio Madrid Garcés.

Línea de Investigación:

Nutrición animal.

Grupo de Investigación:

BIOGEM

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal.

Medellín, Colombia

2020

*“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad”*

*Karl Popper*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la vida por permitirme llegar a este momento de alcanzar un nuevo logro en mi formación, luego de haber atravesado muchas puertas, algunas fáciles otras un poco menos. No me alcanzan las palabras y gestos de gratitud para con mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación profesional; a mi padre por brindarme su sabiduría y enseñarme el esmero para alcanzar los objetivos, a mi madre por la constancia y apoyo ante las circunstancias, y a mi hermano por su acompañamiento y consejos a lo largo de este proceso. Quiero agradecer a Natalia Alejandra por brindarme su compañía, apoyo y palabras de esmero y firmeza para enfrentar y cumplir cualquier objetivo propuesto en la vida aun cuando no se vislumbra el final del camino. Gracias, profesores Jaime Parra y Tomás Madrid por darme la oportunidad de iniciar mi camino como investigador y por todo el acompañamiento continuo en mi formación profesional; gracias por todo el conocimiento que me han transmitido y que cada vez me hace mas ambicioso de aprender y adentrarme en la nutrición animal. Quiero agradecer a Andrés Gómez por introducirme al mundo de los microbiomas y enseñarme las bases que me han permitido avanzar en este campo de la ciencia. Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por abrirme las puertas y brindarme una excelente formación. Finalmente agradezco a todas aquellas personas que me rodearon y estuvieron presentes a lo largo de este proceso, profesores y amigos mil gracias por su apoyo.

# Resumen

Los antibióticos promotores del crecimiento (APC) han sido utilizados por décadas en la alimentación avícola, con el objetivo de garantizar un alto rendimiento y baja mortalidad. La creciente preocupación por el incremento de bacterias resistentes a los antibióticos resultó en la estricta regulación en el uso de los APC, y ha conducido a la búsqueda e investigación de alternativas biológicamente seguras que minimicen la presencia de bacterias patógenas a nivel intestinal, mientras se promueve una mejor salud intestinal y se mantiene un buen rendimiento productivo de las aves. Los probióticos y los extractos de plantas han mostrado ser una alternativa para el reemplazo de los APC en la alimentación de aves de corral, dadas sus bondades sobre la integridad intestinal y el desempeño productivo. En la presente investigación se evaluó el efecto de un probiótico (*Bacillus subtilis*) y el aceite esencial de orégano-AEO (*Lippia Origanoides*) sobre la composición de la microbiota y la morfología intestinal a nivel de íleon y su relación con el desempeño zootécnico en pollos de engorde. Se encontró que tanto el uso de *Bacillus subtilis* como de AEO mejoran el rendimiento productivo (ganancia de peso y conversión alimenticia), la morfometría del íleon, (altura y ancho de la vellosidad y profundidad de la cripta), disminuyen el pH del intestino y modulan de manera favorable la microbiota intestinal conforme avanza la edad del ave. Así, el AEO y *Bacillus subtilis* se proyectan como alternativas para el reemplazo de los APC en la alimentación animal.

**Palabras clave:** Aceite esencial, Antibiótico, Microbioma, Salud Intestinal, Probiótico.

# **Abstract.**

## **Effect of different antimicrobial compounds on the microbiome and intestinal parameters (ileum) in broilers.**

Growth promoting antibiotics (GPA) have been used for decades in poultry feed to ensure high productivity and low mortality. The growing concern about the increase in antibiotic resistant bacteria led to strong regulation in the use of growth promoting antibiotics and it has led to the search and investigation of biologically safe alternatives that minimize the presence of pathogenic bacteria in the intestine while promoting better intestinal health and maintaining good bird performance. Probiotics and plant extracts have been shown to be an alternative to replace GPA in the feed of birds due to the benefits on the integrity of the intestine and the performance of the birds. In the present investigation, the effect of a probiotic (*Bacillus subtilis*) and the oregano essential oil on the composition of the microbiota and intestinal morphology at the ileum level and its relationship with performance in broilers was evaluated. The use of *Bacillus subtilis* and OEO was found to improve performance (weight gain and feed conversion rate), ileum morphology, (height and width of villi and depth of crypts), decreases intestinal pH and favorably modulates the ileum microbiota as the age of the bird advances. In this way, OEO and *Bacillus subtilis* become alternatives to replace GPA in animal feed.

**Key words:** Antibiotic, Essential Oil, Intestinal Health, Microbiome, Probiotic.

# Contenido

<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. PRODUCCIÓN AVÍCOLA Y CONSUMO DE CARNE DE POLLO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. MORFOFISIOLOGÍA GENERAL DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LAS AVES. ....</b>	<b>15</b>
1.3.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LAS AVES.....	16
1.3.2. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN INTESTINAL .....	17
1.3.3. MICROBIOTA INTESTINAL Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO GASTROINTESTINAL Y DESEMPEÑO PRODUCTIVO EN AVES DE CORRAL.....	18
<b>1.4. LOS ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.....</b>	<b>21</b>
1.4.1. GENERALIDADES DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	21
1.4.2. MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO DE LOS APC SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO.....	22
<b>1.5. ACEITES ESENCIALES COMO ALTERNATIVA A LOS APC EN LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA.....</b>	<b>23</b>
1.5.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS FITOBIÓTICOS .....	23
1.5.2. MODO DE ACCIÓN Y EFECTO DEL AEO SOBRE EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO, LA INTEGRIDAD DEL INTESTINO Y LA MICROBIOTA.....	24
<b>1.6. PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA A LOS APC EN LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA .....</b>	<b>27</b>
1.6.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.....	27
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1. GENERAL.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2. ESPECÍFICOS.....</b>	<b>42</b>

<b>2.3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>42</b>
-----------------------------	-----------

**CAPÍTULO 3: MORFOMETRÍA Y PH EN ÍLEON DE POLLOS DE ENGORDE SUPLEMENTADOS CON AEO (*LIPPIA ORIGANOIDES*) Y *BACILLUS SUBTILIS* COMO ALTERNATIVAS AL USO DE APC. ....43**

<b>3.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	45
3.2.2. LOCALIZACIÓN .....	45
3.2.3. ANIMALES.....	45
3.2.4. MANEJO SANITARIO .....	45
3.2.5. DIETAS .....	46
3.2.6. BUENAS PRÁCTICAS DE EUTANASIAS PARA TOMA DE MUESTRAS .....	46
3.2.7. ANÁLISIS DE MORFOMETRÍA INTESTINAL DE MUESTRAS.....	48
3.2.8. ANÁLISIS DEL PH INTESTINAL.....	49
3.2.9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	49
<b>3.3. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
3.3.1. MORFOMETRÍA DEL ÍLEON. ....	49
3.3.2. PH INTESTINAL.....	51
<b>3.4. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>52</b>
<b>3.5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>54</b>

**BIBLIOGRAFÍA.....55**

**CAPÍTULO 4: MICROBIOMA EN ÍLEON DE POLLOS DE ENGORDE SUPLEMENTADOS CON ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*LIPPIA ORIGANOIDES*) Y *BACILLUS SUBTILIS* COMO ALTERNATIVAS AL USO DE APC. ....61**

<b>4.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>62</b>
4.2.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	62
4.2.2. LOCALIZACIÓN .....	63
4.2.3. ANIMALES.....	63
4.2.4. MANEJO SANITARIO .....	63
4.2.5. DIETAS .....	63
4.2.6. BUENAS PRÁCTICAS DE EUTANASIA PARA TOMA DE MUESTRAS .....	63
4.2.7. SECUENCIACIÓN CON TECNOLOGÍA ILLUMINA DE AMPLICONES DE REGIONES HIPERVARIABLES DEL GEN 16S rRNA GENERADOS DESDE ADN METAGENÓMICO Y FLUJO DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO PARA DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE MICROBIOMAS .....	63
4.2.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	64
4.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
<b>4.3. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>72</b>
<b>4.5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>75</b>

**BIBLIOGRAFÍA.....76**



**CAPÍTULO 5: VARIABLES ZOOTÉCNICAS Y SU RELACIÓN CON LA MORFOMETRÍA INTESTINAL Y EL MICROBIOMA EN POLLOS DE ENGORDE SUPLEMENTADOS CON AEO (*LIPPIA ORIGANOIDES*) Y *BACILLUS SUBTILIS* COMO ALTERNATIVAS AL USO DE APC.....82**

<b>5.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>84</b>
5.2.1.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	84
5.2.2.	LOCALIZACIÓN .....	84
5.2.3.	ANIMALES.....	84
5.2.4.	MANEJO SANITARIO .....	84
5.2.5.	DIETAS .....	84
5.2.6.	PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANIMAL .....	85
5.2.7.	BUENAS PRÁCTICAS DE EUTANASIAS PARA TOMA DE MUESTRAS .....	85
5.2.8.	ANÁLISIS DE MORFOMETRÍA INTESTINAL DE MUESTRAS.....	85
5.2.9.	ANÁLISIS DEL PH INTESTINAL.....	85
5.2.10.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	85
<b>5.3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>86</b>
<b>5.4.</b>	<b>DISCUSIÓN. ....</b>	<b>88</b>
<b>5.5.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>89</b>

**BIBLIOGRAFÍA.....91**

**CAPÍTULO 6: CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES .....97**

<b>6.1.</b>	<b>SOBRE EL ANTIBIÓTICO PROMOTOR DE CRECIMIENTO (APC): .....</b>	<b>97</b>
<b>6.2.</b>	<b>SOBRE <i>BACILLUS SUBTILIS</i>:.....</b>	<b>97</b>
<b>6.3.</b>	<b>SOBRE EL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (<i>LIPPIA ORIGANOIDES</i>):.....</b>	<b>97</b>
<b>6.4.</b>	<b>CONCLUSIÓN GENERAL. ....</b>	<b>98</b>
<b>6.5.</b>	<b>RECOMENDACIÓN. ....</b>	<b>98</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Aporte nutricional de la dieta basal (DB) diseñada en dos etapas: iniciación y finalización .....	47
<b>Tabla 2.</b> Efecto del uso de aceite esencial de orégano ( <i>Lippia origanoides</i> ) y <i>Bacillus subtilis</i> sobre la morfometría del íleon en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	50
<b>Tabla 3.</b> Efecto del uso de aceite esencial de orégano ( <i>Lippia origanoides</i> ) y <i>Bacillus subtilis</i> sobre el pH del íleon en pollos de engorde a los 21 días y 42 días de edad. ....	52
<b>Tabla 4.</b> Efecto del uso de aceite esencial de orégano ( <i>Lippia origanoides</i> ) y <i>Bacillus subtilis</i> sobre el rendimiento productivo en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	86

## Lista de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Efecto del uso de aceite esencial de orégano ( <i>Lippia origanoides</i> ) y <i>Bacillus subtilis</i> sobre el rendimiento productivo en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	51
<b>Gráfica 2.</b> Efecto de AEO ( <i>Lippia origanoides</i> ) y <i>Bacillus subtilis</i> sobre la variabilidad en la composición taxonómica de la microbiota ileal en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	66
<b>Gráfica 3.</b> Efecto de la suplementación con AEO ( <i>Lippia Origanoides</i> ) y <i>Bacillus subtilis</i> sobre la riqueza y uniformidad de los ecosistemas microbianos a nivel de íleon en pollos a los días 21 y 42 de edad. ....	67
<b>Gráfica 4.</b> Abundancia relativa de filos bacterianos a nivel de íleon en pollos alimentados con APC o <i>Bacillus subtilis</i> o AEO a los 21 y 42 días de edad. ....	68
<b>Gráfica 5.</b> Efecto de la suplementación con APC o <i>Bacillus subtilis</i> o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo de las Actinobacterias en pollos de engorde. a los 21 y 42 días de edad.....	69
<b>Gráfica 6.</b> Efecto de la suplementación con APC o <i>Bacillus subtilis</i> o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo de los Bacteroidetes en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	70
<b>Gráfica 7.</b> Efecto de la adición de APC o <i>Bacillus subtilis</i> o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo Firmicutes en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	71
<b>Gráfica 8.</b> Efecto de la suplementación con APC o <i>Bacillus subtilis</i> o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo Proteobacterias en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad. ....	72
<b>Gráfica 9.</b> Correlación entre el rendimiento zootecnico, la morfometría del intestino y el pH en pollos de engorde. ....	87

# Introducción.

La industria avícola ha evolucionado rápidamente a sistemas de producción cada vez más intensivos, donde se alojan altas densidades de animales por unidad de área, con aves más eficientes productivamente pero menos adaptadas a condiciones de estrés, más susceptibles a problemas de salud y desequilibrios en la microbiota normal del intestino; hechos caracterizados por el aumento de poblaciones patógenas que pueden ocasionar enfermedades y afectar negativamente el desempeño de las aves.

La necesidad de la industria avícola de mantener altos niveles de producción, eficiencia en la conversión alimenticia y, mejorar la salud y el bienestar de los animales, llevó al uso de antibióticos como aditivos específicos en el alimento como una medida profiláctica y de promoción del crecimiento (APC), dando lugar a la exposición de un gran número de animales a dosis subterapéuticas de APC, independiente de su estado de salud. Sin embargo, el uso de antibióticos en la dieta resulta en problemas comunes tales como: desarrollo de cepas bacterianas resistentes a estos compuestos, residuos de antibióticos en el producto final, y un desbalance en la microbiota normal del intestino.

La comunidad científica ha manifestado una gran preocupación por el alarmante incremento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y el alto riesgo de transmisión a los seres humanos, lo que supone un grave problema en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la medicina humana; por lo cual la unión europea prohibió el uso de antibióticos como medida profiláctica en producciones animales desde enero de 2006. Por su parte, en Colombia se reglamentó el uso de productos o sustancias antimicrobianas como promotores del crecimiento o mejoradoras de la eficiencia alimenticia (*Resolución ICA N° 1966, 1984*); sin embargo, solo en los últimos años se ha prohibido algunos antimicrobianos promotores del crecimiento (Colistina, Polimixina B, Furazolidona, Nitrofurazona y Furaltadona) en la alimentación animal (*Resolución ICA N° 1082, 1995; Resolución ICA N° 22747, 2018*), lo que hará cada vez más restringido el uso de APC.

El impacto de la prohibición de los APC's se ha reflejado en la disminución del rendimiento productivo (ganancias de peso, tasa de conversión y mortalidad), como también en la aparición y susceptibilidad de las aves a enfermedades entéricas, las cuales son causadas principalmente por bacterias como *Clostridium perfringes*, *Escherichia Coli*, *Salmonella Enteritidis*, entre otras. Sin embargo, la presión de los consumidores a nivel global y la creciente preocupación hacia los efectos nocivos del uso de antimicrobianos en la alimentación animal, ha estimulado a los investigadores a trabajar en alternativas biológicamente seguras, que disminuyan la colonización intestinal por bacterias patógenas, promoviendo una mejor salud intestinal, manteniendo una tasa

baja de mortalidad y un buen nivel de producción, mientras se preserva el medio ambiente y la salud del consumidor. Entre las alternativas más comunes se han encontrado y utilizado probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgánicos, inmunoestimulantes, aditivos fitogénicos, nanopartículas, etc.

Los aceites esenciales de orégano (AEO) se han propuesto como aditivos naturales para su uso en pollos de engorde; sin embargo, existen diferentes quimiotipos con una amplia diversidad, donde *Lippia Origanoides* es característico respecto a otros quimiotipos de orégano, ya que su composición es predominante en timol y carvacrol, los cuales son compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacteriales. Los investigadores han sugerido diferentes modos de acción de los aceites esenciales sobre el rendimiento productivo en animales de granja: estimulando la secreción de enzimas, modulando el estado inflamatorio del intestino y mejorando la aceptación y consumo del alimento.

Por su parte, los probióticos han sido ampliamente suministrados en avicultura, ya que han mostrado beneficios en la prevención de enfermedades intestinales y mejoras sobre el rendimiento productivo. El uso de *Bacillus subtilis* como probiótico ha generado recientemente gran interés a nivel industrial, ya que tienen la capacidad de formar esporas resistentes a las altas temperaturas y variaciones de pH que les permite sobrevivir a la acidez estomacal, además de aportar efectos benéficos al hospedador como: estimulación del sistema inmune, modulación de la microbiota intestinal y regulación de la microestructura (vellosidades) intestinal.

Con base en estudios previos realizados por el grupo de investigación BIOGEM e investigaciones en las que se reporta los beneficios de los aditivos anteriormente mencionados sobre el rendimiento productivo, se propuso una investigación que explicara el efecto del AEO (*Lippia origanoides*), *Bacillus subtilis* y un antibiótico comercial sobre el desempeño zootécnico de pollos de engorde y su relación con la morfometría del epitelio intestinal y el microbioma a nivel de íleon, como segmento del intestino delgado donde se encuentra una mayor carga bacteriana con respecto a duodeno y yeyuno, y como barrera que regula el paso de microorganismos del tracto posterior.

# Capítulo 1: Marco teórico

## 1.1. Seguridad alimentaria

En los últimos años, el incremento de la población mundial ha sido de manera acelerada. “La organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), pronosticó que para el año 2050 la población mundial será de alrededor 9100 millones de habitantes” (Vázquez et al., 2018), razón por la cual, la seguridad alimentaria y los programas de lucha contra el hambre han tomado un papel importante en las políticas gubernamentales. Sin embargo, esto ha conducido al incremento en la demanda de alimentos y a su vez, al aumento en el consumo de proteínas de origen animal (FAO & OMS, 2018).

La FAO propone que la seguridad alimentaria “existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, económico y social a alimentos inocuos y nutritivos de manera suficiente, de tal manera que satisfagan sus necesidades nutricionales diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana” (Friedrich, 2014; Soares et al., 2020); a partir de esta definición, las proteínas de origen animal juegan un papel muy importante en la alimentación y salud humana, dado su alto valor biológico y funcionalidad (Milford et al., 2019).

Los sistemas de producción pecuarios han sido desafiados a producir alimentos en grandes volúmenes, inocuos, de buena calidad y a bajo costo (Henchion et al., 2017). Sin embargo, la FAO sugiere que para enfrentar la creciente demanda de alimentos, se debe considerar el ahorro y protección de los recursos naturales, mediante la implementación de sistemas productivos intensivos altamente sostenibles (Perez-Garcés, 2017). Lo anterior implica un cambio en el modelo actual de producción fundamentado en el modelo de revolución verde, el cual es altamente dependiente de insumos y considera los perjuicios ambientales ocasionados como un hecho inevitable de la producción (Friedrich, 2014). Por su parte, la intensificación sostenible, hace uso de herramientas biológicas y procesos naturales para incrementar la productividad y minimizar los impactos medio ambientales (Pérez-Garcés & Silva-Quiroz, 2019).

## 1.2. Producción avícola y consumo de carne de pollo.

Las actuales demandas de proteínas de origen animal, ha estimulado a las producciones avícolas modernas a ser cada vez más intensivas y adaptarse a las condiciones del entorno buscando ser eficientes (FAO et al., 2018). La avicultura se ha caracterizado por los cortos ciclos de producción, grandes avances en el mejoramiento genético, aumento en el desempeño productivo y eficiencia

en la conversión del alimento en proteína, haciendo así un importante aporte en la seguridad alimentaria y nutrición humana, dado el alto valor nutritivo y costo relativamente bajo de sus productos (Wahyono & Utami, 2018).

Los mayores productores de carne de pollo a nivel mundial, se encuentran actualmente en América, donde Estados Unidos y Brasil lideran los mayores volúmenes de producción, seguidos de Perú, Canadá, México y Colombia (Milford et al., 2019; Mottet & Tempio, 2017). El sector avícola colombiano ha sido uno de los sectores más dinámicos en la economía agropecuaria del país, mostrando un continuo crecimiento en los últimos años. Entre los años de 1980 y 2013, el crecimiento de la producción de carne de pollo fue de 7,5% promedio anual, al pasar de 108.910 toneladas (ton) a 1.275.515 ton” (Aguilera-Díaz, 2014). Cifras más recientes de FENAVI reportan que para el año 2019 la producción total de carne de pollo fue de 1.693.178 ton, lo que representó un crecimiento de 3,9% frente al año 2018, el cual finalizó con una producción de 1.629.659 ton. A nivel nacional, se espera una producción proyectada para el año 2020 de 1.736.064 ton de carne de pollo (FENAVI 2020).

Además del continuo crecimiento, la industria avícola aporta productos importantes y de alto impacto para la canasta familiar, siendo las proteínas derivadas de la avicultura las más consumidas por los colombianos. Para el año 2019, el consumo per cápita de carne de pollo en Colombia fue de 36.47 kg, mientras que el de huevos fue de 291 unidades; por su parte, el encasetamiento de pollo de engorde ascendió a 842 millones de aves en el mismo año. Las anteriores cifras indican que estas dos proteínas juegan un papel importante en la alimentación del país (FENAVI 2020).

### **1.3. Morfofisiología general del sistema digestivo de las aves.**

El óptimo rendimiento productivo en los pollos de engorde es alcanzado mediante una eficiente tasa de crecimiento y de conversión alimenticia. Sin embargo, diversos factores como: el ambiente, la nutrición, el equilibrio de la microbiota intestinal, la calidad del alimento y el manejo hacen vulnerable al tracto digestivo de las aves, afectando el consumo, la utilización de nutrientes y por tanto, la eficiencia productiva. El tracto digestivo de las aves de producción ha tenido que adaptarse a enormes cambios, debido a la intensificación de la industria para alcanzar una elevada tasa de crecimiento. En el caso de pollos de engorde, un sistema digestivo maduro y funcional es indispensable para un eficiente rendimiento productivo (Sugiharto, 2016).

Los procesos de digestión y absorción de nutrientes son poco eficientes en los primeros días post-eclosión, como consecuencia de la inmadurez del intestino; sin embargo, tras el aumento en el área superficial de las vellosidades intestinales y la maduración de los enterocitos, se evidencia

un incremento en la actividad enzimática y de transporte en la membrana de los enterocitos, lo que favorece la digestión del alimento (Li et al., 2020; Zaefarian et al., 2016). Los primeros 14 días de vida del pollo son críticos para el desarrollo y maduración del intestino delgado, pues durante este período ocurren los principales cambios fisiológicos y morfológicos que conducirán al establecimiento de un intestino óptimo y funcional (Stadnicka et al., 2020). Así, el tipo de manejo que afecte el buen desarrollo y posterior integridad del intestino, afectarán la salud y el posterior desempeño de las aves.

### **1.3.1. Descripción general del sistema digestivo de las aves**

Anatómicamente el sistema digestivo de las aves es diferente al de otras especies animales. La principal diferencia con respecto a otros monogástricos radica en la presencia de pico, buche, molleja y en algunas aves la presencia de ciegos (Svihus, 2014).

El pico es el primer órgano que entra en contacto con el alimento, sirviendo para la prensión y deglución. En las aves, el alimento es deglutido sin ningún tratamiento, pasando directamente al buche, el cual es considerado una elongación del esófago, allí se da el almacenamiento, humectación y reblandecimiento del alimento. Posteriormente, en el estómago glandular o proventrículo, el cual presenta un pH de 3.5, se da inicio a la proteólisis del alimento por la secreción glandular de HCL y pepsina. Por su parte, en la molleja ubicada hacia la parte caudal del proventrículo se da lugar a un proceso de digestión estrictamente mecánico (molienda de los alimentos) y sus movimientos varían en intensidad según sea la naturaleza de la dieta (Sergeant et al., 2014; Clavijo & Flórez, 2018).

En el intestino delgado tiene lugar el mayor proceso de digestión enzimática y absorción de nutrientes. Este se divide en tres segmentos: duodeno, yeyuno e íleon. En el duodeno desembocan los conductos pancreáticos y biliares cuyas secreciones dan inicio a la digestión enzimática, por lo que se considera uno de los segmentos más importantes en el proceso digestivo (Kers et al., 2018). Sin embargo, es en el yeyuno donde se da la mayor absorción de nutrientes. El íleon es el último segmento del intestino delgado, allí puede tener lugar la digestión y absorción de algunos nutrientes como lípidos, aminoácidos y almidones, aunque en muy baja proporción; además, este segmento cumple un papel muy importante de barrera biológica que controla el paso de microorganismos del intestino grueso hacia el intestino delgado (Clavijo & Flórez, 2018).

Los ciegos encontrados en algunas aves son una característica particular de su tracto digestivo. Estas estructuras se ubican en la unión del íleon y el colon como sacos ciegos alargados, su función principal es llevar a cabo la fermentación de los nutrientes que no fueron asimilados en el intestino delgado; mientras que en el colon se da como principal función la absorción de agua y electrolitos (Svihus, 2014). En la parte más caudal del tracto digestivo se ubica el recto donde



se da la acumulación de las heces y finalmente se encuentra la cloaca donde convergen el tracto digestivo, urinario y reproductor de las aves.

### **1.3.2. Morfología y función intestinal**

El tracto gastrointestinal (TGI) es un órgano complejo y dinámico, que permanece expuesto a un entorno luminal severo, por el que transitan toxinas y organismos patobiontes. De esta manera, el intestino debe proporcionar una barrera que garantice la salud del ave y evite una hiperactivación del sistema inmune. Sin embargo, al mismo tiempo, el TGI debe captar y transportar eficientemente nutrientes lumbales, agua y electrolitos, que son vitales para el mantenimiento y el crecimiento (Moeser et al., 2017).

La capa única de células epiteliales que recubren el TGI representa la interfaz más grande entre el ave y el mundo exterior. A parte de sus funciones especializadas, cada célula forma parte de una barrera física a los contenidos lumbales, sirviendo como primera línea de defensa. Uno de los mecanismos más importantes es el establecimiento de una barrera de permeabilidad, la cual es regulada principalmente por la capa mucosa del epitelio intestinal y las proteínas de uniones estrechas entre enterocitos (Jayaraman & Nyachoti, 2017). La importancia crítica de la regulación de la permeabilidad epitelial radica en la prevención de importantes enfermedades, incluidos los trastornos funcionales e inflamatorios crónicos que ocurren a nivel intestinal (Liu et al., 2018).

- **Vellosidades y criptas intestinales.**

El tejido epitelial alberga diferentes estructuras entre las que se encuentran vellosidades (recubiertas por microvellosidades) y criptas. Las vellosidades se extienden a largo del epitelio intestinal y se encuentran conformadas principalmente por tres tipos de células: enterocitos, células caliciformes y células entero-endocrinas. Los enterocitos son células maduras encargadas de la digestión y absorción de nutrientes; por su parte, las células caliciformes se encargan de la secreción de moco, el cual es un material viscoso compuesto de agua y glicoproteínas que proporciona una barrera contra la invasión de agentes patógenos (Pluske et al., 2018); mientras que las células entero-endocrinas regulan la actividad de las células epiteliales. La superficie de contacto de las vellosidades es amplificada por microvellosidades que permiten amplificar la superficie de contacto con el alimento, haciendo más eficiente la absorción de nutrientes (Rodríguez-González & Moreno-Figueredo, 2016).

Las criptas intestinales, son invaginaciones del epitelio alrededor de las vellosidades, donde se albergan células jóvenes que secretan electrolitos y fluidos; en la base de estas estructuras se encuentran células totipotenciales (madres) que constantemente se dividen y diferencian dando

origen a las células epiteliales de la mucosa, permitiendo regenerar y reemplazar las células desprendidas o dañadas de las vellosidades (Benavides, 2011). Los enterocitos maduran durante el proceso de migración desde la base hacia el ápice de las vellosidades donde se establecen los enterocitos maduros con una mayor capacidad en su actividad enzimática y transporte de nutrientes (Li et al., 2020); finalmente, los enterocitos son desprendidos hacia el lumen intestinal luego de un periodo de 48 a 96 horas (Moreno-Figueredo & Rodríguez-Gonzales, 2015). Así, el aumento en el área superficial del intestino, caracterizado por vellosidades más altas y anchas que albergan enterocitos maduros en su tercio superior (borde de cepillo), da lugar a una mejor función de digestión y absorción del intestino (Li et al., 2020; Wang et al., 2019; Wang et al., 2020).

El incremento de la tasa de descamación celular de las vellosidades se debe principalmente al inicio del consumo de alimento, aumento de la inflamación del epitelio y disbiosis de los ecosistemas microbianos intestinales (Wealleans, Sirukhi, & Egorov, 2017; Wilson et al., 2018). El aumento en la descamación conduce a una amplia proliferación celular en la cripta para garantizar una adecuada tasa de renovación celular y la reposición en la pérdida de las células de la región apical de las vellosidad, lo que conduce a un aumento en la profundidad de las criptas como consecuencia del aumento en la tasa de mitosis, implicando un incremento en la presencia de enterocitos inmaduros a lo largo de la vellosidad y un aumento en el gasto energético asociado al recambio celular (Kogut et al., 2017; Peng et al., 2016). Por tanto, una mejor estructura intestinal (vellosidades más largas y amplias, y criptas menos profundas) es fundamental para garantizar una mejor digestión y absorción de nutrientes, menor gasto energético de mantenimiento y por ende un mejor desempeño productivo (Cheng et al., 2018).

Otro factor importante en el mantenimiento de la salud e integridad del intestino delgado es el control del crecimiento de microorganismos provenientes del intestino grueso. El íleon es la porción distal del intestino delgado que se comunica con el intestino grueso a través de la válvula ileocecal; aunque en esta porción los procesos de digestión y absorción de nutrientes son mínimos, se caracteriza por albergar una amplia y variada comunidad microbiana (Svihus, 2014). Además, cumple una importante función de barrera, ya que regula el crecimiento de microorganismos provenientes del intestino grueso, controlando de esta manera la colonización del intestino delgado por microorganismos patógenos (Zhu et al., 2018).

### **1.3.3. Microbiota intestinal y su relación con el desarrollo gastrointestinal y desempeño productivo en aves de corral**

- **Microbiota y microbioma**

El tracto gastrointestinal (TGI) es la caja de un complejo y dinámico ecosistema de microorganismos, donde se albergan cientos de especies microbianas. La microbiota intestinal hace referencia al conjunto de microorganismos que conforman los ecosistemas microbianos presentes a lo largo TGI (Ventoso-García, 2017). Dichos microorganismos han establecido complejas relaciones simbióticas con su hospedero a lo largo del periodo evolutivo, hasta el punto de influir de manera directa o indirecta en el desarrollo y maduración del sistema inmune, el metabolismo energético, la integridad y desarrollo del intestino, el comportamiento y el bienestar del hospedador (Zierer et al., 2018; Lopetuso et al., 2018).

Por su parte, el microbioma hace referencia a la colección de genes, proteínas y metabolitos que conforman y/o están presentes en la microbiota. El total de genes presentes en el microbioma intestinal de las aves de producción aporta entre 40 y 50 veces más genes que el propio genoma de dichas aves, dejando a disposición una amplia variedad de genes que permiten codificar funciones adicionales como la síntesis de enzimas para el desdoblamiento de carbohidratos estructurales y la síntesis de metabolitos producto de la fermentación de dichos carbohidratos (Kogut, 2019b) (Lopetuso et al., 2017). Así, el microbioma ha sido designado como el genoma colectivo de la microbiota, con capacidad de regular la fisiología, el metabolismo y el comportamiento del hospedador (Fontané et al., 2018).

- **Composición de la microbiota intestinal.**

El TGI de las aves esta densamente poblado con comunidades microbianas complejas (bacterias, arqueas, hongos, protozoos y virus) que son dominadas por las bacterias en más de un 90%. Más de 900 especies bacterianas agrupadas en 13 filos han sido identificadas en el TGI de pollos de engorde mediante técnicas de secuenciación del gen 16S rRNA, donde el filo *Firmicutes* representan aproximadamente el 70% de la población total, mientras que *Bacteroidetes* y *Proteobacterias* se encuentran en menor cantidad: 12,3% y 9,3% respectivamente (Borda-Molina et al., 2018; Taylor et al., 2020).

Según Ellis et al. (2016), “los pollitos de un día de edad ya albergan una gran comunidad de microorganismos en su tracto intestinal”. Estos microorganismos pueden ser adquiridos en la fase de pre-eclosión, ya sea directamente de la madre en el oviducto o por medio del ambiente, esto debido a que los microorganismos presentes en la madre o en el entorno de incubación tienen la capacidad de penetrar las barreras físicas del huevo (Roto et al., 2016). Investigaciones desarrolladas para evaluar la presencia de microorganismos en el intestino de pollitos de un día de nacidos, han evidenciado la formación de ecosistemas bacterianos poco diversos en el intestino

delgado y contenido cecal, cuyas comunidades bacterianas fueron adquiridas en el periodo de pre-closión (Pedroso et al., 2016; Kogut, 2019).

En general, la microbiota presente en el TGI de las aves varía de acuerdo a diferentes factores tales como: la dieta, el ambiente, la edad, el sexo, etc. Sin embargo, los diversos compartimentos del TGI poseen diferentes funciones metabólicas y aportan condiciones ambientales que modulan las comunidades microbianas allí presentes (Kers et al., 2018b).

La riqueza y abundancia microbiana del intestino delgado es menor en comparación a la del tracto posterior, puesto que se ve afectada por el pH ligeramente ácido y la tasa de pasaje alta, lo que implica el crecimiento de microorganismos capaces de adaptarse al pH y adherirse a la capa mucosa para poder proliferar, a diferencia del tracto posterior donde la tasa de pasaje es relativamente baja y el ambiente se torna más favorable para el crecimiento de comunidades bacterianas más diversas (Yadav & Jha, 2019). El filo *Firmicutes* representa la mayor proporción bacteriana del intestino delgado, siendo *Lactobacillus* el género dominante, llegando a alcanzar hasta el 90% de las bacterias presentes en duodeno y yeyuno (Kogut, 2019a). En íleon terminal se encuentran niveles altos de bacterias anaerobias, tales como *Clostridium spp*, *Bacteroides spp* y *Bifidus spp*; sin embargo, los géneros predominantes a lo largo del intestino incluyen géneros como: *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bacteroides* y *Streptococcus* (Osho, 2020).

- **El microbioma y su relación con la integridad del intestino.**

Han sido diversas las interacciones halladas entre el hospedador y su microbiota intestinal, encontrando entre las más importantes: el intercambio de nutrientes, la exclusión competitiva de patógenos, la maduración y modulación del sistema inmune y la estimulación en el desarrollo del epitelio intestinal (Maltecca et al., 2019).

Las bacterias intestinales tienen la capacidad de aprovechar compuestos que no son desdoblados por las enzimas digestivas del hospedador. El proceso de fermentación llevado a cabo por las bacterias finaliza con la síntesis de compuestos como: vitaminas (vitamina k y vitaminas del complejo B), ácidos grasos de cadena (ácido acético, propiónico y butírico) y ácidos orgánicos (ácido láctico), que actúan como moléculas de señalización en la regulación de procesos fisiológicos y metabólicos (Postler & Ghosh, 2017; Iljazovic et al., 2020) o como sustrato para el desarrollo de las células epiteliales del intestino, lo cual favorece el rendimiento productivo de las aves (Fang et al., 2020).

La microbiota puede formar una barrera protectora sobre la pared epitelial del intestino al reducir la oportunidad de colonización por parte de microorganismos patógenos (Kers et al., 2018). La

microbiota intestinal regula la colonización de bacterias patógenas por medio de la exclusión competitiva, la cual puede ser el resultado de diferentes mecanismos, entre los que se destaca, la ocupación física, la competencia por los nutrientes o mediante la confrontación química directa por la producción de compuestos como ácidos orgánicos o bacteriocinas (Kuritza et al., 2014).

Por su parte, el desarrollo intestinal es estimulado por la microbiota, acelerando la proliferación de enterocitos e incrementando el número de células caliciformes, y por ende la producción de mucinas, dando lugar a un intestino más largo y voluminosos, caracterizado por una capa mucosa más gruesa que brinda un mejor recubrimiento de las paredes intestinales, dejando menos expuestas las aves a patógenos e incrementando la protección de la integridad del intestino (Chambers & Gong, 2011).

Este proceso ha sido demostrado en estudios con pollos axénicos (libres de microorganismos), los cuales desarrollan intestinos y ciegos más pequeños con paredes más delgadas en comparación con pollos convencionales, donde estos últimos presentan una microbiota equilibrada (Clavijo & Flórez, 2018). Además, el mejoramiento en el rendimiento productivo, está asociado a una digestión y absorción de nutrientes más eficiente, ya que en los pollos convencionales las vellosidades intestinales son más altas y las criptas menos profundas, lo que brinda una mayor superficie de exposición para la absorción de nutrientes (Mancabelli et al., 2016; Kers et al., 2018).

El balance de las comunidades microbianas del intestino es crucial en el mantenimiento de la salud del hospedador, puesto que los desbalances de estas poblaciones, conocidos como disbiosis, a menudo han sido asociados con varias enfermedades, entre las que destacan enfermedades inflamatorias intestinales, diabetes, obesidad, hígado graso y otras alteraciones metabólicas y/o inmunes (Qin et al., 2018). No obstante, el uso de antibióticos en la alimentación animal ha sido una herramienta ampliamente utilizada para regular los desbalances en la composición de la microbiota intestinal, caracterizados por el crecimiento de microorganismos patógenos que afectan el eficiencia metabólica e integridad intestinal del hospedador (Pereira et al., 2019).

## **1.4. Los antibióticos promotores del crecimiento en la alimentación animal**

### **1.4.1. Generalidades de los antibióticos**

Los antibióticos promotores del crecimiento (APC) en la alimentación animal y su efecto sobre la productividad fueron estudiados por primera vez en la década de 1940, desde entonces su uso como medida profiláctica en la avicultura se ha incrementado con la intensificación de la industria

buscando mejorar los índices de productividad para cubrir el incremento en la demanda de alimentos (Gonzalez-Ronquillo & Angeles-Hernandez, 2017). Según Xie, Shen, & Zhao, (2018) los antibióticos son los promotores de crecimiento más utilizados en la producción animal, representando una herramienta importante para proporcionar una adecuada productividad en animales criados en condiciones intensivas. Un agente antimicrobiano es considerado como promotor del crecimiento, cuando administrado en dosis subterapéuticas por largos períodos como aditivo en la alimentación, tiene efectos positivos sobre el crecimiento, la tasa de conversión alimenticia y el bienestar de los animales (Salim et al., 2018).

Los antibióticos son compuestos de origen natural, sintético o semisintético, que actúan bajo diferentes mecanismos de acción (bactericida o bacteriostático) (Salim et al., 2018). Sin embargo, los efectos funcionales e interactivos de los APC sobre los animales son poco claros. Una variedad de factores, incluyendo la dieta, la presencia de estrés y factores ambientales influyen sobre el hospedador y la composición de la microbiota intestinal, y por ende en la eficiencia de los APC (Dodds, 2017).

#### **1.4.2. Mecanismo de acción y efecto de los APC sobre la microbiota intestinal y el desempeño productivo.**

Las hipótesis centradas en la modulación de la microbiota intestinal por parte de los APC, propone que los cambios inducidos a las comunidades bacterianas llevan a una mejor tasa de crecimiento, lo que puede incluir alteración por la competencia de nutrientes entre microorganismo y hospedador, prevención de la colonización por agentes patógenos y selección de bacterias que pueden extraer mayor energía de la dieta, lo que lleva a una mejor ganancia de peso y tasa de conversión alimenticia (Fasina et al., 2016). Por otra parte, la hipótesis basada en la inmunomodulación de los APC, sugiere que los antibióticos aminoran la inflamación fisiológica de la mucosa intestinal al limitar la cascada de eventos inmunológicos, disminuyendo el costo catabólico para mantener la respuesta inmune y permitiendo de este modo una mayor fuente de nutrientes disponibles para el proceso anabólico (desarrollo de músculo) (Kabloy et al., 2016; Niewold, 2007).

Es importante resaltar, que algunos antibióticos usados en animales como promotores del crecimiento son además administrados terapéuticamente en humanos (tetraciclinas, penicilinas, aminoglucósidos), mientras que otros (ionóforos, monensina) son solamente utilizados en animales (Dodds, 2017). El suministro de los APC ha sido considerado en los últimos años como un factor de riesgo para la salud humana, debido a la selección de microorganismos (bacterias, parásitos y hongos) resistentes a sustancias antimicrobianas, al potencial de transmisión de genes de resistencia a los seres humanos y por posibles residuos de antibióticos en el producto final (carne), generando problemas de salud pública (Hrnčár et al., 2016; Muhammad et al., 2019).

Por lo anterior, la resistencia bacteriana ha pasado de ser una amenaza, para convertirse en una realidad de gran preocupación que conduce a la implementación de cambios drásticos en los actuales patrones de uso de los antibióticos, así como nuevas estrategias para su innovación (García-Sánchez et al., 2020).

Como consecuencia algunas agencias regulatorias se han enfocado en controlar la administración no terapéutica de antimicrobianos a los animales, lo que ha traído consigo un reto para la productividad, el bienestar y salud de los animales, y el balance económico de las granjas (Costa et al., 2017). Esto ha conducido a la búsqueda por parte de los investigadores de alternativas eficaces que reemplacen el uso de antibióticos en la alimentación animal, con la finalidad de preservar una baja tasa de mortalidad y un buen rendimiento productivo mientras se preserva el medio ambiente y la salud del consumidor.

Han sido múltiples las alternativas que han sido estudiadas, entre las cuales se ha reportado el uso de: probióticos, prebióticos, simbióticos, enzimas, ácidos orgánicos, fitobióticos, entre otros, como una estrategia para mejorar la estructura del intestino, modificar la composición de los ecosistemas microbianos intestinales, disminuir el gasto energético producto de los procesos de inflamación intestinal, y favorecer los procesos de digestión/absorción de los nutrientes, y por ende mejorar el rendimiento productivo de los animales (Mohammadi Gheisar & Kim, 2018; Chowdhury et al., 2018; Lokapirnasari et al., 2017; Sugiharto, 2016).

Sin embargo, la óptima combinación de estas alternativas, acopladas con un buen manejo y prácticas de bioseguridad en granja será la llave para maximizar el rendimiento y mantenimiento de la productividad animal, mientras se avanza en el objetivo de reducir el uso de antibióticos en la industria animal.

## **1.5. Aceites esenciales como alternativa a los APC en la producción avícola**

### **1.5.1. Descripción general de los fitobióticos**

Los fitobióticos, también conocidos como fitogénicos son compuestos bioactivos derivados de las plantas, usados tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades, por lo que se han incorporado como aditivos en la alimentación animal como alternativa a los APC, debido a sus bondades en el mejoramiento de la productividad (Mohammadi-Gheisar & Kim, 2018).

Los extractos fitobióticos se pueden clasificar como aceites esenciales (sustancias volátiles lipofílicas obtenidas por extracción en frío o destilación) y oleorresinas (extractos derivados por

solventes no acuosos) (Lillehoj et al., 2018). Los principales compuestos bioactivos de los aceites esenciales son los terpenoides y polifenoles (Moncada et al., 2016).

Los compuestos activos presentes en los aceites esenciales presentan propiedades potenciales sobre algunas funciones biológicas como: el control en el crecimiento de microorganismos al actuar directamente sobre la membrana celular, efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Liu et al., 2018). Sin embargo, dada la amplia diversidad de compuestos que componen los aceites esenciales no se han identificado sitios celulares específicos de unión a las células animales y microbianas (Linde et al., 2016).

En la actualidad, se han usado los aceites esenciales principalmente en la producción de cerdos y aves, mostrando resultados positivos caracterizados por una mejor nutrición, prevención de enfermedades, activación del sistema inmune, y rendimiento productivo. Estas condiciones, han hecho de los aceites esenciales, entre ellos, el aceite esencial de orégano un aditivo importante en la alimentación animal que permite mejorar el rendimiento productivo, la salud y el bienestar de los animales (Zou et al., 2016; Madrid et al., 2017).

Los aceites esenciales de orégano (AEO) se han propuesto como aditivos naturales para su uso en pollos de engorde, existiendo diferentes quimiotipos con una amplia biodiversidad. El género *Lippia* comprende cerca de 200 especies distribuidas por las regiones tropicales, subtropicales y templadas de la América, África y Asia (Linde et al., 2016). *Lippia Origanoides* es característico respecto a otros quimiotipos de orégano, ya que su composición es predominante en timol (entre 67,2% y 78,7%) y baja en carvacrol (entre 0,9% y 1,2%) (Ortiz et al., 2017).

Sin embargo, la composición y concentración de los compuestos activos varía de acuerdo a la especie, parte de la planta de donde se extrae, origen geográfico, condiciones de almacenamiento y técnicas de procesamiento (Sugiharto, 2016). “El rendimiento en la extracción de aceite esencial de orégano varía dependiendo el proceso, la cantidad y caracterización que se requiera del producto final”, por ejemplo, el rendimiento promedio en la extracción aceite esencial de orégano por hidrodestilación es de aproximadamente 2g por cada 100g de hojas (Busatta et al., 2017). En contraste, Moncada, Tamayo, & Cardona (2016) encontraron que el rendimiento de extracción por hidrodestilación puede ser de aproximadamente 9 kg/Ton y con una composición de 86,9% *Timol* y 11,3% *Carvacrol*.

### **1.5.2. Modo de acción y efecto del AEO sobre el rendimiento productivo, la integridad del intestino y la microbiota**

El timol y carvacrol son los principales componentes del AEO *Lippia Origanoides* (Ortiz et al., 2017). El timol y el carvacrol son compuestos fenólicos naturales, con propiedades antioxidantes,



antiinflamatorias y antibacteriales (Kachur & Suntres, 2019). Los investigadores sugieren diferentes modos de acción de los aceites esenciales sobre el rendimiento productivo en animales de granja: estimulando la secreción de enzimas digestivas, modulando el estado inflamatorio del epitelio intestinal, modulando los microbiomas intestinales, disminuyendo el daño sobre los tejidos por efecto de la oxidación, y mejorando la aceptación del alimento e incrementado el consumo (Huang & Lee, 2018) (Liu et al., 2018) (Zhai et al., 2018).

La sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias a nivel intestinal tiene efectos adversos sobre la integridad de la mucosa, dejando expuesto el organismo al ingreso de agentes patógenos, incrementando el gasto energético y afectando el bienestar de los animales (Wang et al., 2018) (Modina et al., 2019). Los compuestos fenólicos como el timol y carvacrol presentes en el aceite esencial de orégano tienen la capacidad de modular la respuesta inmune regulando algunos mediadores inflamatorios como la proliferación de células T y la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  (Huang & Lee, 2018; Orhan et al., 2016).

Uno de los mecanismos de acción mediante el cual el carvacrol y timol generan un efecto antiinflamatorio, es mediante su efecto inhibitorio del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), y de la vía de las MAP quinasas (MAPKs); los cuales juegan un papel clave en la transcripción de genes que codifican para algunas citoquinas proinflamatorias como: IL-8, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (López-Bojorquez, 2004; Somensi et al., 2019).

El carvacrol y timol, además tienen la capacidad de inducir la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes; lo cual protege y fortalece la integridad de la barrera intestinal por disminución del estrés oxidativo sobre las proteínas de barrera (S. D. Liu et al., 2018). Estas proteínas regulan el paso de iones y moléculas vía paracelular en la células epiteliales y endoteliales del intestino (González-Mariscal et al., 2008), además de favorecer el transporte y utilización de los nutrientes presentes en la dieta al garantizar la homeostasis intestinal (González-Mariscal et al., 2008; Sun et al., 2017). Consecuentemente, la restauración de las proteínas de barrera puede ser alcanzada mediante el uso de nutrientes bioactivos como los fitobióticos (Sun et al., 2017; Wang et al., 2019).

Estudios llevados a cabo en cerdos y pollos de engorde han revelado que el uso de AEO en la dieta o sus principios activos (carvacrol y timol) incrementan de manera significativa la expresión de proteínas importantes en la conformación de la barrera (zónula ocludens, claudinas y ocludinas) a nivel intestinal (Liu et al., 2018; Pu et al., 2018).

Por otra parte, se han evidenciado los efectos positivos en el uso de AEO sobre la digestibilidad del alimento. Estudios realizados por Malayoğlu et al. (2010), en los cuales se adicionó AEO de manera individual o en una mezcla comercial de aceites esenciales en la dieta de pollo de engorde incrementó de manera significativa la digestibilidad. Así, el incremento en la digestibilidad

aparente de la proteína y la energía del alimento bajo el uso de aceites esenciales ha sido atribuido a una mayor expresión y actividad de enzimas digestivas a nivel de borde en cepillo (Zhai et al., 2018). Así, estudios realizados en cerdos y aves de corral han reportado incrementos significativos en la digestibilidad de la proteína cruda (Cheng et al., 2018) fósforo, calcio, materia seca y energía bruta del alimento con la adición de AEO (Xu et al., 2018).

Diversos trabajos han reportado el efecto que tiene el uso del AEO y sus principios activos (carvacrol y timol) sobre la morfología del intestino tanto en cerdos como en aves de corral, en las cuales se ha encontrado un incremento significativo en la altura de las vellosidades (Yang, Xin, Yang, & Yang, 2018; Cheng et al., 2018; Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, 2017; Giannenas et al., 2016), una disminución en la profundidad de criptas y un incremento significativo en el área superficial del epitelio intestinal (Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, 2017a), lo cual se ve reflejado en un mejor aprovechamiento de los nutrientes, y por tanto, un incremento en la tasa de crecimiento.

Un ensayo realizado por Du et al. (2016) en pollos de la línea Cobb 500, demostró que la adición de 240 ppm de aceite esencial en el alimento disminuyó las lesiones microscópicas y mejoró la histomorfología intestinal, incrementando la altura de las vellosidades y disminuyendo la profundidad de las criptas en aves retadas con *Clostridium perfringers*. De igual manera, Madrid et al. (2017), encontraron que la adición de 200 ppm de AEO en la dieta para pollos de engorde aumentó la longitud y ancho de las vellosidades, y disminuyó la profundidad y ancho de las criptas a nivel intestinal; conjuntamente, estos autores encontraron que la adición de 200 ppm de aceite esencial de orégano disminuía el pH intestinal de manera significativa en comparación con las dietas control (dieta basal sin y con adición de antibiótico), lo que favorece el control sobre la proliferación de agentes patógenos a nivel intestinal

Además, Madrid et al. (2017), reportaron que la adición de aceite esencial de orégano en concentraciones entre 100 y 200 ppm mejoró la población de células inmunes en sangre y la expresión de títulos de anticuerpos postvacunales contra Newcastle. De manera similar, Du et al. (2016) encontraron que la suplementación con Timol y Carvacrol disminuyó la respuesta inflamatoria y mejoró los títulos de anticuerpos específicos para aves retadas con *Clostridium perfringers*.

En investigaciones realizadas por Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, (2017), se reportó que pollos alimentados con diferentes niveles de AEO (300 y 500 ppm) disminuyeron significativamente las UFC de *E. coli* a nivel ileal, pero no encontraron un efecto favorable sobre las poblaciones de lactobacillus; sin embargo, Giannenas et al., (2016) reportaron valores significativamente altos de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias a nivel de íleon y ciegos en

pollos suplementados con AEO, mientras que en ciegos se encontró una disminución en la población de coliformes. Por su parte, estudios *in vitro* realizados por Ebani et al. (2016), mostraron que la utilización de aceite esencial de orégano (*Oreganum vulgare*) inhibió el crecimiento de *Salmonella Typhimurium*, *Listeria*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus Faecium* y *Enterococcus faecalis* con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 2.37 mg/ml.

## **1.6. Probióticos como alternativa a los APC en la producción avícola**

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos no patógenos, que cuando son administrados en cantidades adecuadas ejercen efectos benéficos sobre la salud del hospedador. Una bacteria es considerada un probiótico cuando: “tiene la habilidad de adherirse a las paredes intestinales del hospedero, excluir o reducir la adherencia de bacterias patógenas, persistir y desarrollar colonias en el intestino y poseer la capacidad de conservar la población de bacterias benéficas para formar una microbiota balanceada” (Kuritza et al., 2014).

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

Se ha evidenciado que los probióticos actúan bajo diferentes modos de acción, mejorando el rendimiento productivo y la salud intestinal de las aves. Según Král, Angelovi, & Mrázová (2012), los probióticos pueden mejorar el rendimiento productivo de las aves manteniendo un balance saludable de bacterias en el intestino por exclusión competitiva contra las bacterias patógenas.

Sugiharto (2016), sugiere que los probióticos promueven la maduración e integridad intestinal y mejoran el metabolismo por incremento de la actividad enzimática. Se ha encontrado que los probióticos favorecen el rendimiento productivo de las aves, ya que garantizan un equilibrio saludable de la microbiota del intestino, ya sea mediante la producción de ácidos orgánicos (Gadde et al., 2017) o por exclusión competitiva, lo cual disminuye el gasto energético que implica la respuesta inmune (Function, Fab, & Negative, 2017), además de mejorar la estructura del epitelio intestinal y favorecer la absorción de los nutrientes (Li et al., 2016).

Un estudio de campo realizado por Hrnčár, Weis, Mindek, & Bujko (2014), demostraron que el uso de *Lactobacillus fermentum* y *Enterococcus faecium* como cepas probióticas mejoraron el peso a los 42 días de manera significativa en comparación con la dieta control (dieta basal sin adición de antibióticos). Resultados similares en pollos de engorde fueron reportados por Mahdavi, Zakeri, Mehmannaavaz, & Nobakht (2013), quienes utilizaron un mezcla comercial de probióticos (*Protexin*), encontrando que los grupos tratados con probióticos tuvieron un peso final

significativamente mayor y tasa de conversión más baja comparado con el grupo control y el grupo tratado con APC (*Virginamicina*). Además, encontraron que la tasa de mortalidad no presentó diferencias significativas entre el tratamiento con probióticos y el tratamiento con *Virginamicina*. Y. Li et al. (2016), reportaron que el uso de una cepa comercial de *B. subtilis* en la dieta de pollos de engorde aumentó significativamente la ganancia diaria de peso (GDP) y disminuyó la tasa de conversión.

En estudios realizados por Chávez et al. (2016), encontraron que la adición de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en el agua de bebida de pollos de engorde, mejoró la altura de las vellosidades y disminuyó la profundidad de las criptas intestinales, lo cual incrementa la superficie de contacto para la absorción de nutrientes y disminuye el gasto de energía implicado en el recambio celular, trayendo consigo mejoras en el rendimiento productivo. Igualmente Stef et al. (2017) reportaron que la adición de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus lactis*, en la dieta generó cambios en la estructura de los géneros que componen la microbiota cecal de pollos de engorde.

En estudios de campo realizados por Král et al. (2014) encontraron que la adición de una cepa de *Bacillus subtilis* incrementó significativamente el número de UFC para *Enterococcus spp* y disminuyó de manera significativa el número promedio UFC de coliformes en intestino y ciegos con respecto al tratamiento control (dieta basal sin ninguna adición). Son diversos los reportes publicados en los que se hace referencia del incremento en el rendimiento productivo de pollos de engorde mediante el uso de *B. subtilis* como aditivo alimentario, convirtiéndolo en una alternativa viable frente al uso de APCs (Park et al., 2020; Al-Fataftah & Abdelqader, 2014; Boroojeni et al., 2018; Jayaraman et al., 2017). Por su parte, Qin et al. (2018) mencionaron que la alteración en la estructura de la microbiota intestinal juega un papel clave en el desarrollo gastrointestinal y metabolismo energético, contribuyendo en gran medida en la fermentación de carbohidratos y proteínas, mejorando efectivamente el crecimiento y la tasa de conversión alimenticia.

En general, aunque se han reportado estudios sobre el efecto de los probióticos y aceites esenciales sobre parámetros productivos e intestinales en pollos de engorde, no es claro el efecto que estas alternativas a los APC tienen sobre el microbioma y su relación con los parámetros morfométricos a nivel de intestino. Las principales dificultades cuando se quiere estudiar la microbiota intestinal, radica en la reproducción de las condiciones ambientales que rodean a las bacterias del intestino, entre las que se incluyen: “condiciones estrictamente anaerobias, la necesidad de co-cultivo con otras bacterias que facilite la interacción entre ellas, y la extrema sensibilidad de las bacterias a la congelación”(Mancabelli et al., 2016).

Por lo anterior, nuestro conocimiento de la microbiota se ha limitado a microorganismos que pueden recuperarse utilizando medios de cultivo; sin embargo, menos del 20% de los microorganismos encontrados en el TGI se han cultivado debido al hecho de que la mayoría de las bacterias intestinales exigen con frecuencia condiciones específicas para su crecimiento, lo que dificulta entender el comportamiento y la compleja relación existente entre el hospedero y la microbiota dentro del tracto gastrointestinal (Clavijo & Flórez, 2018). Esto ha conducido al uso de técnicas de secuenciación y bioinformática que permitan determinar con mayor precisión la composición de la microbiota intestinal (Guevarra et al., 2019).

## Bibliografía.

- Aguilera Díaz, M. (2014). Determinantes del desarrollo de la avicultura en Colombia: instituciones, organizaciones y tecnología. *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional. Banco de La Republica*.
- Al-Fataftah, A. R., & Abdelqader, A. (2014). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. *Animal Feed Science and Technology*, *198*, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.10.012>
- Benavides, J. (2011). Evaluación de la mezcla de un prebiótico y un ácido orgánico en la salud intestinal y parámetros productivos de pollos de engorde. In *Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira- Facultad De Ciencias Agropecuarias: Vol. Primera ed.*
- Birchenough, G. M. H., Dalgakiran, F., Witcomb, L. A., Johansson, M. E. V., McCarthy, A. J., Hansson, G. C., & Taylor, P. W. (2017). Postnatal development of the small intestinal mucosa drives age-dependent, regio-selective susceptibility to *Escherichia coli* K1 infection. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00123-w>
- Borda-Molina, D., Seifert, J., & Camarinha-Silva, A. (2018). Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *16*, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.03.002>
- Borojeni, F. G., Vahjen, W., Männer, K., Blanch, A., Sandvang, D., & Zentek, J. (2018). *Bacillus subtilis* in broiler diets with different levels of energy and protein. *Poultry Science*, *97*(11), 3967–3976. <https://doi.org/10.3382/ps/pey265>
- Busatta, C., Barbosa, J., Cardoso, R. I., Paroul, N., Rodrigues, M., Oliveira, D. de, Oliveira, J. V. de, & Cansian, R. L. (2017). Chemical profiles of essential oils of marjoram (*Origanum majorana*) and oregano (*Origanum vulgare*) obtained by hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Essential Oil Research*, *29*(5), 367–374. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1340197>
- Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, *44*(10), 3149–3159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.017>
- Chávez, L. A., López, A., & Parra, J. E. (2016). Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos de Zootecnia*, *65*(249), 51–58. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21071/az.v65i249.441>
- Cheng, C., Xia, M., Zhang, X., Wang, C., Jiang, S., & Peng, J. (2018). Supplementing oregano essential oil in a reduced-protein diet improves growth performance and nutrient digestibility by modulating intestinal bacteria, intestinal morphology, and antioxidative capacity of growing-finishing pigs. *Animals*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/ani8090159>

- Chowdhury, S., Mandal, G. P., & Patra, A. K. (2018). Different essential oils in diets of chickens: 1. Growth performance, nutrient utilisation, nitrogen excretion, carcass traits and chemical composition of meat. *Animal Feed Science and Technology*, 236(September 2017), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.002>
- Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, 97(3), 1006–1021. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>
- Costa, M. C., Bessegatto, J. A., Alfieri, A. A., Weese, J. S., Filho, J. A. B., & Oba, A. (2017). Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *PLoS ONE*, 12(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171642>
- Dodds, D. R. (2017). Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochemical Pharmacology*, 134, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.005>
- Du, E., Wang, W., Gan, L., Li, Z., Guo, S., & Guo, Y. (2016). Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0079-7>
- Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Giovanelli, S., Rocchigiani, G., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2016). Antibacterial and antifungal activity of essential oils against some pathogenic bacteria and yeasts shed from poultry. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(4), 302–309. <https://doi.org/10.1002/ffj.3318>
- Ellis, J. C., Ballou, A. L., Hassan, H. M., Koci, M. D., Croom, W. J., Ali, R. A., & Mendoza, M. A. (2016). Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00002>
- Fang, S., Chen, X., Ye, X., Zhou, L., Xue, S., & Gan, Q. (2020). Effects of Gut Microbiome and Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Finishing Weight of Meat Rabbits. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01835>
- FAO, OPS, WFP, & UNICEF. (2018). *Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en america latina y el caribe*. <http://www.fao.org/publications/es>
- Fasina, Y. O., Newman, M. M., Stough, J. M., & Liles, M. R. (2016). Effect of *Clostridium perfringens* infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of broiler chickens. *Poultry Science*, 95(2), 247–260. <https://doi.org/10.3382/ps/pev329>
- Fontané, L., Benaiges, D., Goday, A., Llauradó, G., & Pedro-Botet, J. (2018). Influence of the microbiota and probiotics in obesity. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis (English Edition)*, 30(6), 271–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.artere.2018.10.002>
- Friedrich, T. (2014). La seguridad alimentaria: retos actuales. *Revista Cubana de Ciencia*

- Agricola*, 48(4), 319–322. <https://doi.org/Disponible> en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193033033001> Cómo
- Gadde, U. D., Oh, S., Lee, Y., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2017). Dietary *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials alleviate LPS-induced intestinal immunological stress and improve intestinal barrier gene expression in commercial broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 114, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.004>
- García-Sánchez, L., Melero, B., Diez, A. M., Jaime, I., Canepa, A., & Rovira, J. (2020). Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 176, 104935. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104935>
- Giannenas, I., Tzora, A., Sarakatsianos, I., Karamoutsios, A., Skoufos, S., Papaioannou, N., Anastasiou, I., & Skoufos, I. (2016). The Effectiveness of the Use of Oregano and Laurel Essential Oils in Chicken Feeding. *Annals of Animal Science*, 16(3). <https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0099>
- González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 729–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- Gonzalez Ronquillo, M., & Angeles Hernandez, J. C. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>
- Guevarra, R. B., Lee, J. H., Lee, S. H., Seok, M. J., Kim, D. W., Kang, B. N., Johnson, T. J., Isaacson, R. E., & Kim, H. B. (2019). Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–10.
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, 6(7), 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Hrnčár, C., Gašparovič, M., Weis, J., Arpášová, H., Pistová, V., Fik, M., & Bujko, J. (2016). Effect of Three-strains Probiotic on Productive Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 49 (2), 149–154.
- Hrnčár, C., Weis, J., Mindek, S., & Bujko, J. (2014). Effect of Probiotic Addition in Drinking Water on Body Weight and Body Measurements of Broiler Chickens. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 47(2), 249–253.
- Huang, C. M., & Lee, T. T. (2018). Immunomodulatory effects of phytochemicals in chickens and pigs — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(5), 617–627. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0657>
- Iljazovic, A., Roy, U., Gálvez, E. J. C., Lesker, T. R., Zhao, B., Gronow, A., Amend, L., Will, S.



- E., Hofmann, J. D., Pils, M. C., Schmidt-Hohagen, K., Neumann-Schaal, M., & Strowig, T. (2020). Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunology*, September 2019. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0296-4>
- Jang, I. S., Ko, Y. H., Kang, S. Y., & Lee, C. Y. (2017). Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 134(3–4), 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009>
- Jayaraman, B., & Nyachoti, C. M. (2017). Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*, 3(3), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.002>
- Jayaraman, S., Das, P. P., Saini, P. C., Roy, B., & Chatterjee, P. N. (2017). Use of *Bacillus Subtilis* PB6 as a potential antibiotic growth promoter replacement in improving performance of broiler birds. *Poultry Science*, 96(8), 2614–2622. <https://doi.org/10.3382/ps/pex079>
- Kabploy, K., Bunyaphatsara, N., & Phumala, N. (2016). Original Article Effect of Antibiotic Growth Promoters on Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities in Broiler Chickens. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 46(1), 89–95.
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2019). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., & Smidt, H. (2018a). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235>
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., & Smidt, H. (2018b). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235>
- Kogut, M. H. (2019a). The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 250(October 2018), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008>
- Kogut, M. H. (2019b). The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 250(February 2018), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008>
- Kogut, M. H., Yin, X., Yuan, J., & Broom, L. (2017). Gut health in poultry. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 12(August). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201712031>
- Král, M., Angelovi, M., & Mrázová, L. (2012). Application of Probiotics in Poultry Production. *Animal Science and Biotechnologies*, 45(1), 55–57.

- <https://doi.org/10.5829/idosi.bjps.2017.46.52>
- Král, M., Angelovičová, M., Alfaig, E., Bučko, O., & Walczycka, M. (2014). Influence of *Bacillus subtilis* and Acetic Acid on Cobb500 Intestinal Microflora. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 47(2), 22–25.
- Kuritz, L. N., Westphal, P., & Santin, E. (2014). Probióticos na avicultura. *Ciência Rural*, 44(8), 1457–1465. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120220>
- Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Frehner, M., Losa, R., & Beynen, A. C. (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*, 44(3), 450–457. <https://doi.org/10.1080/0007166031000085508>
- Li, C. L., Wang, J., Zhang, H. J., Wu, S. G., Hui, Q. R., Yang, C. B., Fang, R. J., & Qi, G. H. (2019). Intestinal morphologic and microbiota responses to dietary *Bacillus* spp. in a broiler chicken model. *Frontiers in Physiology*, 10(JAN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01968>
- Li, H., Cheng, J., Yuan, Y., Luo, R., & Zhu, Z. (2020). Age-related intestinal monosaccharides transporters expression and villus surface area increase in broiler and layer chickens. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Vol. 104, Issue 1, pp. 144–155). <https://doi.org/10.1111/jpn.13211>
- Li, R. X., Li, J., Zhang, S. Y., Mi, Y. L., & Zhang, C. Q. (2018). Attenuating effect of melatonin on lipopolysaccharide-induced chicken small intestine inflammation. *Poultry Science*, March. <https://doi.org/10.3382/ps/pey084>
- Li, Y., Xu, Q., Huang, Z., Lv, L., Liu, X., Yin, C., Yan, H., & Yuan, J. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 195–204. <https://doi.org/10.1111/jam.12972>
- Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M. E., Chi, F., Cravens, R. L., Oh, S., & Gay, C. G. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary Research*, 49(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0562-6>
- Linde, G. A., Colauto, ;, Albertó, ;, & Gazim, ; (2016). Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*. *Rev. Bras. Pl. Med*, 1, 191–200. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_037](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037)
- Liu, S. D., Song, M. H., Yun, W., Lee, J. H., Lee, C. H., Kwak, W. G., Han, N. S., Kim, H. B., & Cho, J. H. (2018). Effects of oral administration of different dosages of carvacrol essential oils on intestinal barrier function in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1257–1265. <https://doi.org/10.1111/jpn.12944>
- Liu, S., Song, M., Yun, W., Lee, J., Lee, C., Kwak, W., Han, N., Kim, H., & Cho, J. (2018). Effects of oral administration of different dosages of carvacrol essential oils on intestinal

- barrier function in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, April, 1257–1265. <https://doi.org/10.1111/jpn.12944>
- Liu, Y., Espinosa, C. D., Abelilla, J. J., Casas, G. A., Lagos, L. V., Lee, S. A., Kwon, W. B., Mathai, J. K., Navarro, D. M. D. L., Jaworski, N. W., & Stein, H. H. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Animal Nutrition*, 4(2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.007>
- Lokapirnasari, W. P., Dewi, A. R., Fathinah, A., Hidanah, S., Harijani, N., Soeharsono, Karimah, B., & Andriani, A. D. (2017). Effect of probiotic supplementation on organic feed to alternative antibiotic growth promoter on production performance and economics analysis of quail. *Veterinary World*, 10(12), 1508–1514. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1508-1514>
- Lopetuso, L., Petito, V., Graziani, C., Schiavoni, E., Paroni Sterbini, F., Poscia, A., Gaetani, E., Franceschi, F., Cammarota, G., Sanguinetti, M., Masucci, L., Scaldaferri, F., & Gasbarrini, A. (2017). Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders? *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 36. <https://doi.org/10.1159/000477205>
- Lopetuso, L. R., Petito, V., Graziani, C., Schiavoni, E., Paroni Sterbini, F., Poscia, A., Gaetani, E., Franceschi, F., Cammarota, G., Sanguinetti, M., Masucci, L., Scaldaferri, F., & Gasbarrini, A. (2018). Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Digestive Diseases*, 36(1), 56–65. <https://doi.org/10.1159/000477205>
- López-Bojorquez, L. (2004). La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, 56, 83–92.
- Madrid Garcés, T. A., Parra Suescun, J. E., & Lopez Herrera, A. (2017). La inclusión de aceite esencial de orégano (*Lippia organoides*) mejora parámetros inmunológicos en pollos de engorde. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 75. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)75-83](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)75-83)
- Madrid Garcés, T. A., Parra Suescún, J. E., & López Herrera, A. (2017). La ingesta de aceite esencial de orégano (*Lippia organoides*) mejora la morfología intestinal en Broilers. *Archivos de Zootecnia*, 66(254), 287–299. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21071/az.v66i254.2334>
- Mahdavi, S., Zakeri, A., Mehmannaavaz, Y., & Nobakht, A. (2013). Comparative study of probiotic, acidifier, antibiotic growth promoters and prebiotic on activity of humoral immune and performance parameters of broiler chickens. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(2), 295–299.

- Malayoğlu, H. B., Baysal, Ş., Misirliölu, Z., Polat, M., Yilmaz, H., & Turan, N. (2010). Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. *British Poultry Science*, *51*(1), 67–80. <https://doi.org/10.1080/00071660903573702>
- Maltecca, C., Bergamaschi, M., & Tiezzi, F. (2019). The interaction between microbiome and pig efficiency: A review. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *137*. <https://doi.org/10.1111/jbg.12443>
- Mancabelli, L., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Turroni, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Viappiani, A., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2016). Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environmental Microbiology*, *18*(12), 4727–4738. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13363>
- Milford, A. B., Le Mouël, C., Bodirsky, B. L., & Rolinski, S. (2019). Drivers of meat consumption. *Appetite*, *141*, 104313. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.06.005>
- Modina, S. C., Polito, U., Rossi, R., Corino, C., & Di Giancamillo, A. (2019). Nutritional regulation of gut barrier integrity in weaning piglets. *Animals*, *9*(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ani9121045>
- Moeser, A. J., Pohl, C. S., & Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition*, *3*(4), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003>
- Mohammadi Gheisar, M., & Kim, I. H. (2018). Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*, *17*(1), 92–99. <http://10.0.4.56/1828051X.2017.1350120>
- Mohiti-Asli, M., & Ghanaatparast-Rashti, M. (2017a). Comparing the effects of a combined phytogenic feed additive with an individual essential oil of oregano on intestinal morphology and microflora in broilers. In *Journal of Applied Animal Research* (pp. 1–6). <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1284074>
- Mohiti-Asli, M., & Ghanaatparast-Rashti, M. (2017b). Comparing the effects of a combined phytogenic feed additive with an individual essential oil of oregano on intestinal morphology and microflora in broilers. *Journal of Applied Animal Research*, *2119*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1284074>
- Moncada, J., Tamayo, J. A., & Cardona, C. A. (2016). Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Oregano (*Origanum vulgare*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in Colombia. *Journal of Cleaner Production*, *112*, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.067>
- Moreno Figueredo, G., & Rodríguez Gonzales, S. P. (2015). *desarrollo del intestino delgado en pollos de engorde*. *13*(1), 49–58.

- Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 245–256. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>
- Muhammad, J., Khan, S., Su, J. Q., Hesham, A. E. L., Ditta, A., Nawab, J., & Ali, A. (2019). Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. In *Journal of Soils and Sediments*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02360-0>
- Niewold, T. A. (2007). The Nonantibiotic Anti-Inflammatory Effect of Antimicrobial Growth Promoters , the Real Mode of Action ? A Hypothesis. *Poultry Science*, 86(4), 605–609.
- Orhan, I. E., Mesaik, M. A., Jabeen, A., & Kan, Y. (2016). Immunomodulatory properties of various natural compounds and essential oils through modulation of human cellular immune response. *Industrial Crops and Products*, 81, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.088>
- Ortiz, R. E., Vásquez, D., Afanador, G., & Ariza, C. (2017). Efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* Kunth en la estabilidad oxidativa de huevos almacenados. *Archivos de Zootecnia*, 66(253), 73–79. <https://doi.org/10.21071/az.v66i253.2128>
- Osho, S. (2020). *HEALTH AND FUNCTION OF GASTROINTESTINAL TRACT AS INFLUENCED BY DIETARY IMMUNOMODULATORY COMPONENTS IN POULTRY*. Purdue University Graduate School. <https://doi.org/10.25394/PGS.11858067.V1>
- Oso, A. O., Suganthi, R. U., Reddy, G. B. M., Malik, P. K., Thirumalaisamy, G., Awachat, V. B., Selvaraju, S., Arangasamy, A., & Bhatta, R. (2012). Effect of dietary supplementation with phytogenic blend on growth performance , apparent ileal digestibility of nutrients , intestinal morphology , and cecal microflora of broiler chickens. *Poultry Science*, 98(10), 4755–4766. <https://doi.org/10.3382/ps/pez191>
- Park, I., Lee, Y., Goo, D., Zimmerman, N. P., Smith, A. H., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2020). The effects of dietary *Bacillus subtilis* supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, and epithelial barrier integrity in broiler chickens infected with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, 99(2), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.002>
- Pedroso, A., Batal, A., & Lee, M. (2016). Effect of in ovo administration of an adult-derived microbiota on establishment of the intestinal microbiome in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 77, 514–526. <https://doi.org/10.2460/ajvr.77.5.514>
- Peng, Q. Y., Li, J. D., Li, Z., Duan, Z. Y., & Wu, Y. P. (2016). Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 214, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>
- Pereira, R., Bortoluzzi, C., Durrer, A., Fagundes, N. S., Pedroso, A. A., Rafael, J. M., Perim, J.

- E. de L., Zavarize, K. C., Napy, G. S., Andreote, F. D., Costa, D. P., & Menten, J. F. M. (2019). Performance and intestinal microbiota of chickens receiving probiotic in the feed and submitted to antibiotic therapy. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(1), 72–86. <https://doi.org/10.1111/jpn.13004>
- Perez Garcés, R. (2017). Seguridad alimentaria , factor clave del desarrollo. *Asuntos Economicos y Administrativos*, *32*, 37–50.
- Pérez Garcés, R., & Silva Quiroz, Y. (2019). Enfoques y factores asociados a la inseguridad alimentaria. *RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición*, *18*(1), 15–24. <https://doi.org/10.29105/respyn18.1-3>
- Placha, I., Takacova, J., Ryzner, M., Cobanova, K., Laukova, A., Stropfova, V., Venglovska, K., & Faix, S. (2014). Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *British Poultry Science*, *55*(1), 105–114. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.873772>
- Pluske, J. R., Turpin, D. L., & Kim, J. C. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, *4*(2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004>
- Postler, T., & Ghosh, S. (2017). Understanding the Holobiont: How microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Physiology & Behavior*, *26*(1), 110–130. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.008>. Understanding
- Pu, J., Chen, D., Tian, G., He, J., Zheng, P., Mao, X., Yu, J., Huang, Z., Zhu, L., Luo, J., Luo, Y., & Yu, B. (2018). Protective Effects of Benzoic Acid, Bacillus Coagulans, and Oregano Oil on Intestinal Injury Caused by Enterotoxigenic Escherichia coli in Weaned Piglets. *BioMed Research International*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/1829632>
- Qin, C., Gong, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, B., Li, Y., & Li, W. (2018). Effect of Saccharomyces boulardii and Bacillus subtilis B10 on gut microbiota modulation in broilers. *Animal Nutrition*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.004>
- Roto, S. M., Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. (2016). Applications of In Ovo technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 3, Issue AUG, p. 1). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00063>
- Salim, H. M., Huque, K. S., Kamaruddin, K. M., & Beg, M. A. H. (2018). Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. *Science Progress*, *101*(1), 52–75. <https://doi.org/10.3184/003685018X15173975498947>
- Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T. A., Bedford, M. R., Penn, C. W., & Pallen, M. J. (2014). Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941>
- Soares, P., Almendra-Pegueros, R., Benítez-Brito, N., Fernández-Villa, T., Lozano-Lorca, M., Valera-Gran, D., & Navarrete-Muñoz, E. M. (2020). Sustainable food systems for healthy

- eating. *Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica*, 24(2).  
<https://doi.org/10.14306/renhyd.24.2.1058>
- Somensi, N., Rabelo, T. K., Guimarães, A. G., Quintans-Junior, L. J., de Souza Araújo, A. A., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2019). Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*, 75(April), 105743.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105743>
- Stadnicka, K., Bogucka, J., Stanek, M., Graczyk, R., Krajewski, K., Maiorano, G., & Bednarczyk, M. (2020). Injection of raffinose family oligosaccharides at 12 days of egg incubation modulates the gut development and resistance to opportunistic pathogens in broiler chickens. *Animals*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ani10040592>
- Stef, L., Julean, C., Cean, A., Simiz, E., Stef, D. S., Marcu, A., Pet, I., Pacala, N., & Corcionivoschi, N. (2017). *Influence of Additional Level of Probiotics on Intestinal Microbiota in Broiler Chickens*. 50(2), 34–40.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>
- Sun, K., Lei, Y., Wang, R., Wu, Z., & Wu, G. (2017). Cinnamaldehyde regulates the expression of tight junction proteins and amino acid transporters in intestinal porcine epithelial cells. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0186-0>
- Svihus, B. (2014). Function of the digestive system. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(2), 306–314. <https://doi.org/10.3382/japr.2014-00937>
- Taylor, K. J. M., Ngunjiri, J. M., Abundo, M. C., Jang, H., Elaish, M., Ghorbani, A., Kc, M., Weber, B. P., Johnson, T. J., & Lee, C. W. (2020). Respiratory and Gut Microbiota in Commercial Turkey Flocks with Disparate Weight Gain Trajectories Display Differential Compositional Dynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12).  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00431-20>
- Vázquez, A. P., Trinidad, D. A. L., & Merino, F. C. G. (2018). Desafíos y propuestas para lograr la seguridad alimentaria hacia el año 2050. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(1), 175–189.
- Ventoso García, B. (2017). *MICROBIOTA Y METABOLISMO: LA IMPORTANCIA DE LA MICROBIOTA EN EL CORRECTO FUNCIONAMIENTO FISIOLÓGICO* (3Ciencias ed., Vol. 4). Ciencia y letras .
- Wahyono, N. D., & Utami, M. M. D. (2018). A Review of the Poultry Meat Production Industry for Food Safety in Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 953(1).  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/953/1/012125>

- Wang, L., Zhu, F., Yang, H., Li, J., Li, Y., Ding, X., Xiong, X., & Yin, Y. (2019). Effects of dietary supplementation with epidermal growth factor on nutrient digestibility, intestinal development and expression of nutrient transporters in early-weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(2), 618–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.13059>
- Wang, M., Yang, C., Wang, Q., Li, J., Huang, P., Li, Y., Ding, X., Yang, H., & Yin, Y. (2020). The relationship between villous height and growth performance, small intestinal mucosal enzymes activities and nutrient transporters expression in weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*(2), 606–615. <https://doi.org/10.1111/jpn.13299>
- Wang, Q., Sun, Q., Qi, R., Wang, J., Qiu, X., Liu, Z., & Huang, J. (2019). Effects of *Lactobacillus plantarum* on the intestinal morphology, intestinal barrier function and microbiota composition of suckling piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(6), 1908–1918. <https://doi.org/10.1111/jpn.13198>
- Wang, Y., Xie, Q., Sun, S., Huang, B., Zhang, Y., Xu, Y., Zhang, S., & Xiang, H. (2018). Probiotics-fermented *Massa Medicata Fermentata* ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(24), 10713–10727. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9438-y>
- Wealleans, A. L., Sirukhi, M., & Egorov, I. A. (2017). Performance, gut morphology and microbiology effects of a *Bacillus* probiotic, avilamycin and their combination in mixed grain broiler diets. *British Poultry Science*, *58*(5), 523–529. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1349298>
- Wilson, F. D., Cummings, T. S., Barbosa, T. M., Williams, C. J., Gerard, P. D., & Peebles, E. D. (2018). Comparison of two methods for determination of intestinal villus to crypt ratios and documentation of early age-associated ratio changes in broiler. *Poultry Science*, 1757–1761.
- Xie, W.-Y., Shen, Q., & Zhao, F. J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European Journal of Soil Science*, *69*(1), 181–195. <https://doi.org/10.1111/ejss.12494>
- Xu, Y. T., Liu, L., Long, S. F., Pan, L., & Piao, X. S. (2018). Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, *235*(July 2017), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.10.012>
- Yadav, S., & Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. In *Journal of Animal Science and Biotechnology* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0310-9>
- Yang, X., Xin, H., Yang, C., & Yang, X. (2018). Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive functions and immunity of broiler chickens. *Animal*



- Nutrition*, 4(4), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.005>
- Zaefarian, F., Abdollahi, M., & RAVINDRAN, V. (2016). Particle size and feed form in broiler diets: Impact on gastrointestinal tract development and gut health. *World's Poultry Science Journal*, 72, 277–290. <https://doi.org/10.1017/S0043933916000222>
- Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., & Klunter, A. M. (2018). Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*, 4(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>
- Zhang, J., Wu, G., Shan, A., Han, Y., Jin, Y., Fang, H., Zhao, Y., Shen, J., Zhou, C., Li, C., Chen, L., Zhou, Y., Wang, X., Liu, D., & Yu, H. (2017). Dietary glutamine supplementation enhances expression of ZO-1 and occludin and promotes intestinal development in Min piglets. *Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences*, 67(1–2), 15–21. <https://doi.org/10.1080/09064702.2017.1333133>
- Zhu, H., Zeng, D., Wang, H., Xu, S., Zhou, Y., Zhou, M., Ni, X., Zeng, Y., Pan, K., Jing, B., & Lin, Y. (2018). *Bacillus licheniformis* normalize the ileum microbiota of chickens infected with necrotic enteritis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20059-z>
- Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Peng, J., & Wei, H. (2016). *Oregano Essential Oil Improves Intestinal Morphology and Expression of Tight Junction Proteins Associated with Modulation of Selected Intestinal Bacteria and Immune Status in a Pig Model*. 2016.

## Capítulo 2: Objetivos

### 2.1. General

Evaluar el efecto de diferentes compuestos antimicrobianos como aditivos alimentarios sobre la microbiota y parámetros intestinales en pollos de engorde.

### 2.2. Específicos

- Identificar el efecto de la adición de diferentes compuestos antimicrobianos (AEO–*Lippia origanoides*, probiótico–*Bacillus subtilis* y antibiótico promotor del crecimiento–APC) sobre la morfometría (vellosidades y criptas), y pH intestinal (íleon) en pollos de engorde.
- Establecer el efecto del aceite esencial de orégano (AEO) *Lippia origanoides*, probiótico–*Bacillus subtilis* y antibiótico promotor del crecimiento–APC sobre la microbiota intestinal (íleon) en pollos de engorde.
- Determinar la relación entre la microbiota y parámetros intestinales con parámetros zootécnicos en pollos de engorde que fueron adicionados con diferentes compuestos antimicrobianos

### 2.3. Hipótesis

El uso de probióticos (*Bacillus subtilis*) y/o aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) como aditivos alternativos a los APC, favorecen el rendimiento productivo, la salud intestinal y la composición de la microbiota intestinal (íleon) en pollos de engorde.

# **Capítulo 3: Morfometría y pH en íleon de pollos de engorde suplementados con AEO (*Lippia Origanoides*) y *Bacillus subtilis* como alternativas al uso de APC.**

## **3.1. Introducción.**

En los sistemas de producción avícola actuales se crían aves de alto potencial genético para la producción de carne o huevos; sin embargo, estos animales presentan una alta susceptibilidad a desordenes entéricos ocasionados principalmente por desbalances en la microbiota normal del intestino, caracterizados por disminución en la diversidad de los ecosistemas microbianos y aumento en las poblaciones de bacterias patógenas tales como: *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Shigella*, entre otros, que comprometen la salud del intestino y el bienestar de los animales (Oviedo-Rondón, 2019).

El TGI representa una cavidad expuesta al ambiente externo por donde transitan alimentos, nutrientes, microorganismos y diferentes agentes patógenos, convirtiéndolo en un órgano complejo. El intestino debe captar y, transportar la energía y los nutrientes necesarios para el mantenimiento de las funciones fisiológicas y el buen desempeño productivo de las aves (Moeser et al., 2017; Rocha et al., 2016); además, debe proporcionar una barrera contra los microorganismos patógenos y sus toxinas con el fin de evitar el ingreso al torrente sanguíneo, la hiperactivación del sistema inmune, y a su vez garantizar la salud de las aves (Liu et al., 2018).

El tejido epitelial del intestino se encuentra formado por pequeñas estructuras en forma de dedos llamadas vellosidades y sobre las cuales se ubican numerosas microvellosidades encargadas de amplificar el área de contacto con el contenido intestinal, con el fin de hacer más eficiente el proceso de digestión y absorción de nutrientes (H. Li et al., 2020; L. Wang et al., 2019; M. Wang et al., 2020). Por su parte, las criptas ubicadas en la base de las vellosidades albergan células

madre constantemente se dividen para regenerar y reemplazar las células epiteliales que se han descamado de las vellosidades (Benavides, 2011).

Cada una de las células epiteliales que recubre el TGI forma una barrera natural contra diferentes agentes patógenos que están presentes en el lumen intestinal. La capa mucosa formada por glicoproteínas y las proteínas de unión estrecha entre enterocitos regulan la permeabilidad del epitelio (Jayaraman & Nyachoti, 2017; Liu et al., 2018). Sin embargo, la pérdida del equilibrio en el entorno intestinal a raíz de los cambios en los ecosistemas microbianos intestinales y/o alteraciones en el epitelio intestinal, conducen al incremento de microorganismos patógenos o la presencia de sustancias perjudiciales que aumentan la tasa de descamación celular de las vellosidades e incrementan la inflamación del epitelio (Wealleans, Sirukhi, & Egorov, 2017; Wilson et al., 2018), lo cual genera disminución en el tamaño de las vellosidades, afectando los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Chávez et al., 2016). Así, la morfología intestinal se convierte en un buen indicador de la salud intestinal, donde se pretende aumentar el tamaño de las vellosidades y disminuir la profundidad de las criptas (Qaisrani et al., 2014; Peng, Li, Li, Duan, & Wu, 2016).

Los antibióticos suministrados en bajas dosis a través del alimento han contrarrestado los efectos desfavorables asociados a los desequilibrios de los ecosistemas microbianos sobre las diferentes estructuras del intestino (Fasina et al., 2016), favoreciendo así la disminución en el gasto energético asociado a la respuesta inmune, mejorando la salud del intestino y aumentando la utilización de los nutrientes (Cowieson & Klunter, 2018). Sin embargo, la exposición continua de los microorganismos a bajas dosis de antibióticos ha desencadenado el surgimiento de bacterias resistentes a estos medicamentos (Arenas & Melo, 2018), lo cual se ha convertido en un riesgo para la salud pública, dado el posible contagio de los seres humanos y la presencia de residuos de antibióticos en carne (Muhammad et al., 2019).

La regulación en el uso de antibióticos promotores de crecimiento por parte de entidades gubernamentales ha conducido a la búsqueda de alternativas biológicamente seguras que garanticen un óptimo rendimiento productivo y bienestar de los animales (Costa et al., 2017). Son múltiples las alternativas que han sido estudiadas, dentro de las cuales se ha reportado el uso de: probióticos, prebióticos, simbióticos, fitobióticos, enzimas, ácidos orgánicos, entre otros (Mehdi et al., 2018). Sin embargo, los probióticos y aceites esenciales (AEO - *Lippia organoides*) han mostrado resultados prometedores dado sus beneficios a nivel intestinal, ya que bajo diferentes modos de acción mejoran la morfología del epitelio, modifican el equilibrio de la microbiota, disminuyen el gasto catabólico asociado a la respuesta inmune, y mejoran el rendimiento productivo al favorecer la digestión y absorción de los nutrientes (Mohammadi-Gheisar & Kim, 2018; Chowdhury et al., 2018; Lokapirnasari et al., 2017).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto en el uso de AEO (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre la morfometría (altura y ancho de las vellosidades, y profundidad de las criptas) y el pH del fíleon en pollos de engorde.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Consideraciones éticas**

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a las guías propuestas por “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (Iclas, 2012; Leary *et al.*, 2013). Esta investigación ha sido avalada por el Comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. CEMED-013 del 4 de mayo de 2016.

### **3.2.2. Localización**

El trabajo de campo se adelantó en la Estación Agraria San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ubicada en el municipio de Rionegro, paraje “El Tablacito”, localizado a 2100 msnm, con una temperatura entre 12 y 18°C, correspondiendo a una zona de vida bosque muy húmedo Montano bajo (bmh-MB).

### **3.2.3. Animales**

Se utilizaron 196 pollos machos de línea genética ROSS308 de un día de nacidos y alojados en corrales en piso, con las condiciones de densidad de una producción comercial (8 aves/m<sup>2</sup> a día 42), de los cuales fueron seleccionados de manera aleatoria 52 pollos para la toma de muestras de este experimento. La cría de las aves se llevó a cabo siguiendo los procedimientos comerciales: cinco horas antes de la llegada de los pollitos, las criadoras fueron encendidas con la finalidad de precalentar el galpón y alcanzar una temperatura promedio de 32°C al momento de la recepción de los mismos (Aviagen, 2017) en una granja experimental. Las aves recibieron agua y alimento a voluntad durante todo el periodo experimental el cual tuvo una duración de 42 días.

### **3.2.4. Manejo Sanitario**

Para el recibimiento de las aves de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial y con vacuna Marek, Newcastle y Gumboro; además se desarrollaron los procedimientos de preparación del galpón como se describe a continuación: lavado, limpieza y desinfección del galpón, cortinas, comederos y bebederos; además, se realizó el control de roedores e insectos con productos obtenidos en casas comerciales (Aviagen, 2017).

### 3.2.5. Dietas

Los animales fueron alimentados utilizando cuatro dietas, teniendo como base una dieta comercial (Tabla 1) sin la adición de antibiótico, a la cual se le adicionó para algunos tratamientos antibiótico (Avilamicina-APC), aceite esencial de orégano (AEO-*Lippia Origanoides*) y probiótico (*Bacillus subtilis*), conformando cada una de las dietas, así:

- Dieta Control (CONT): sin la adición de antibiótico, PROB o AEO.
- Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico-APC (Avilamicina, 10 ppm).
- Dieta 3 (AEO): DB más la adición de aceite esencial de orégano (AEO, 150 ppm).
- Dieta 4 (PROB): DB más la adición de esporas de *Bacillus subtilis* (50 ppm).

Se elaboró una dieta con dos etapas que cumplieran con los requerimientos mínimos nutricionales establecidos por su casa genética (Aviagen, 2017) (Tabla 1). El alimento ofrecido en los primeros 21 días del experimento fue denominado de “Iniciación” y el de los siguientes 21 días denominado como de “finalización”. El alimento utilizado en el estudio estuvo libre de antibióticos (excepto la dieta D2, donde se utilizó Avilamicina como APC, como se realiza a nivel comercial). El AEO de *Lippia origanoides* se adicionó como fitobiótico a la premezcla a una concentración efectiva de 150 ppm para la dieta D3 (Madrid-Garcés et al., 2018); mientras que *Bacillus subtilis* se adicionó como probiótico a la premezcla a una concentración de 50 ppm a la dieta D4.

### 3.2.6. Buenas prácticas de eutanasias para toma de muestras

Durante la fase de experimentación se realizaron eutanasias escalonadas de las aves de la siguiente forma: el día 1 se sacrificaron 4 aves (1 ave por cada dieta), que representaron el grupo de referencia para verificar el estado general de salud (evaluación macroscópica de los segmentos intestinales) de las aves antes de suministrar las dietas experimentales, y las unidades experimentales para cada uno de los tratamientos. Los días 21 y 42 se sacrificaron 24 aves/día (seis aves por tratamiento). Todas las aves fueron sacrificadas 2.5 horas después de su última comida. Los animales fueron sedados por inhalación de Nitrox y posteriormente se les realizó la eutanasia humanitaria por inhalación de dióxido de carbono durante 3 minutos (Leary et al., 2013; Chávez et al., 2015).

Posterior al sacrificio de las aves se realizó la técnica de necropsia convencional, retirando en un solo paquete los órganos del tracto gastrointestinal; luego se diseccionó utilizando tijeras de disección con punta recta y se tomaron 2 segmentos de íleon (desde el divertículo de Meckel hasta el inicio de los ciegos) (María-Barrera et al., 2014). Una vez cortadas estas secciones, se realizó un lavado por infusión con solución salina fría de cada porción para eliminar impurezas y contenido digestivo, y luego fueron conservados en formalina buferada al 10% (Madrid et al., 2017).

**Tabla 1.** Aporte nutricional de la dieta basal (DB) diseñada en dos etapas: iniciación y finalización

<b>Ingrediente</b>	<b>Unidad</b>	<b>Iniciación</b>	<b>Finalización</b>
<b>Maíz</b>	%	<b>55,41</b>	<b>56,49</b>
<b>Gluten de maíz</b>	%	<b>3,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Soya integral</b>	%	<b>7,39</b>	<b>10,00</b>
<b>Torta de soya</b>	%	<b>22,19</b>	<b>20,64</b>
<b>Hemoglobina</b>	%	<b>1,43</b>	<b>1,00</b>
<b>Aceite de soya</b>	%	<b>1,99</b>	<b>4,61</b>
<b>Pre mezcla</b>	%	<b>0,69</b>	<b>0,68</b>
<b>Carbonato de calcio</b>	%	<b>1,29</b>	<b>1,11</b>
<b>Sal de mar</b>	%	<b>0,20</b>	<b>0,28</b>
<b>Bicarbonato de sodio</b>	%	<b>0,18</b>	<b>0,04</b>

<b>Aporte nutricional por etapa</b>		<b>Iniciación</b>	<b>Finalización</b>
<b>Nutrientes</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>
Peso	Kg	1.000	1.000
Humedad	%	10.926	10.845
Energía Metabolizable (aves)	KCAL/kg	3 152.165	3 299.259
Proteína bruta	%	21.474	19.976
Grasa	%	8.301	10.213
Extracto Libre de N (ELN)	%	49.673	50.195
Fibra bruta	%	2.927	2.801
Cenizas	%	6.108	5.379
Calcio	%	0.997	0.832
Fósforo disponible	%	0.418	0.360
Fósforo total	%	0.648	0.580
Balance electrolítico	mEq/kg	216.164	191.553
Lisina	%	1.363	1.270
Metionina	%	0.650	0.602
Metionina+ Cisteina	%	0.993	0.924
Treonina	%	0.901	0.825
Triptófano	%	0.242	0.222
Arginina	%	1.336	1.228
Isoleucina	%	0.881	0.815
Leucina	%	1.902	1.802
Valina	%	1.042	0.915
Histidina	%	0.547	0.509
Fenilalanina	%	1.061	0.989
Fenilalanina & Tirosina	%	1.953	1.828
Glicina	%	0.875	0.808
Alanina	%	1.158	1.103

### 3.2.7. Análisis de morfometría intestinal de muestras

Después de 48 horas de colectadas, las muestras obtenidas del intestino delgado fueron llevadas al laboratorio donde se realizó procesamiento histotécnico; los tejidos fueron fijados en formalina tamponada al 10% por 24 horas a 4°C, incluidos en parafina, cortados con un micrótopo a 4 µm de espesor y coloreados con Hematoxilina-Eosina para ser lavados y almacenados en etanol:agua (75:25, v:v) de acuerdo con el método reportado por Vente-Spreeuwenberg et al. (2004) y, Barrera et al. (2014). Posteriormente, estos cortes fueron evaluados para determinar el promedio de la altura y ancho de las vellosidades intestinales, así como la profundidad y ancho de las glándulas o criptas de Lieberkuhn adyacentes. En cada lámina se montaron tres cortes transversales.

Los cortes histológicos fueron analizados cuantitativamente mediante un procesamiento de imágenes digitales computarizadas, así: para la identificación de las zonas tisulares se empleó un microscopio óptico Leica DLMB, luego se capturaron las imágenes correspondientes con una cámara para microscopía digital instantánea Motican 2300 (Motic, Hong Kong, China) con una resolución de 3 megapíxeles, en un aumento de 200x y se analizaron dichas imágenes con el software para tratamiento de imágenes Motic® Images plus 2.0 (Motic, Hong Kong, China). Las variables morfométricas que se midieron en cada corte histológico fueron:

*Altura de vellosidad:* se establece la base de la vellosidad, desde su punto medio se trazó una línea hasta el ápice.

*Ancho de vellosidad:* con una línea se unieron los bordes apicales de las células epiteliales de lados opuestos, ubicadas aproximadamente en la mitad de la vellosidad.

*Profundidad de la cripta:* se midió desde el epitelio hasta el fondo (invaginación) de las glándulas intestinales, además del número de vellosidades por campo de lectura, conforme a lo descrito previamente por Marion *et al.* (2002), Vente-Spreeuwenberg *et al.* (2004), Barrera *et al.* (2014). Se evaluó la relación altura vellosidad/profundidad de la cripta como indicador del desarrollo morfométrico digestivo (Santos et al., 2016).

El valor promedio para cada variable se calculó después de realizar mediciones en ocho vellosidades y sus correspondientes criptas intestinales. Debido al hecho de que la altura de las vellosidades puede variar en cada pliegue intestinal, siendo más corta en el ápice, se requería que cada región estuviera igualmente representada en la evaluación. En consecuencia, se eligió un pliegue circular de la mucosa, donde se miden dos vellosidades desde la parte inferior, dos a la derecha, dos desde el lado izquierdo y dos desde el vértice (Parra et al., 2016; Itza-Ortiz et al., 2019).



### **3.2.8. Análisis del pH intestinal**

Para la determinación del pH intestinal se tomó 1 g de muestra de contenido de íleon, que luego fue suspendido en 12,5 ml de agua destilada-desionizada. Esta mezcla se agitó manualmente con agitador de vidrio lavándolo en cada registro con agua destilada. Posteriormente se insertó en la mezcla un electrodo de pH y se realizaron las lecturas en un potenciómetro con precisión de tres decimales. El pH de la suspensión fue medido dentro de los 45 minutos subsiguientes al sacrificio de las aves (Madrid et al., 2017).

### **3.2.9. Diseño experimental y análisis estadístico.**

Para el análisis de las variables de morfometría se realizó un modelo de parcelas divididas bajo un esquema de aleatorización completamente al azar con seis repeticiones. Las parcelas grandes fueron constituidas por las dietas y las subparcelas por los diferentes días de sacrificio. Cada animal fue asignado aleatoriamente a cada uno de los tratamientos (dieta \* edad de sacrificio). El análisis estadístico se realizó usando el procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales) PROC MIXED del SAS® software, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2017) (SAS/STAT® Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute., 2017). Las posibles diferencias entre las medias de los diferentes tratamientos fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA). El análisis de comparaciones múltiples entre medias de cada tratamiento se llevó a cabo mediante una prueba HSD de Tukey para detectar significancia ( $p < 0.05$ ) entre medias.

## **3.3. Resultados.**

En general las aves que consumieron las diferentes dietas presentaron buen estado de salud, sin síntomas o signos adversos de enfermedad que causaran su retiro y/o eutanasia antes de los periodos de toma de muestras; adicionalmente, las aves consumieron la ración diaria de alimento ajustada a la guía de manejo de la línea genética Ross308. Dado que no se presentó una interacción significativa ( $p > 0.05$ ) entre la dieta y la edad de sacrificio, ambos factores fueron analizados de manera independiente.

### **3.3.1. Morfometría del íleon.**

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para el desarrollo morfométrico del íleon bajo el uso de los diferentes aditivos antimicrobianos. En general, la altura y ancho de las vellosidades del íleon se incrementaron conforme avanzó la edad de las aves. En lo referente a la altura promedio de la vellosidad, se puede observar que el uso de *Bacillus subtilis* (PROB) y AEO (*Lippia origanoides*) aumentan de manera significativa ( $p < 0,05$ ) la altura de la vellosidad en comparación al uso de Avilamicina (ANT) en la dieta. Además, el tratamiento PROB mejoró

significativamente ( $p < 0,05$ ) la altura de la vellosidad en comparación a los demás tratamientos. En cuanto al ancho de las vellosidades es evidente que tanto el tratamiento PROB como el tratamiento AEO tienen un efecto significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación al tratamiento ANT. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para el ancho de vellosidades bajo el uso de AEO y *Bacillus subtilis*. Tanto para altura como para ancho de vellosidades se observó un comportamiento similar entre los diferentes tratamientos para el día 21 y 42.

La profundidad de las criptas de íleon se observaron estadísticamente reducidas ( $p < 0,05$ ) en las aves que fueron alimentadas con el tratamiento PROB en comparación a los demás tratamientos. No obstante, el efecto en la adición de AEO fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación al uso de antibiótico. El comportamiento en la profundidad de la cripta anteriormente descrito entre los diferentes tratamientos fue similar para los días 21 y 42.

**Tabla 2.** Efecto del uso de aceite esencial de orégano (*Lippia organoides*) y *Bacillus subtilis* sobre la morfometría del íleon en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.

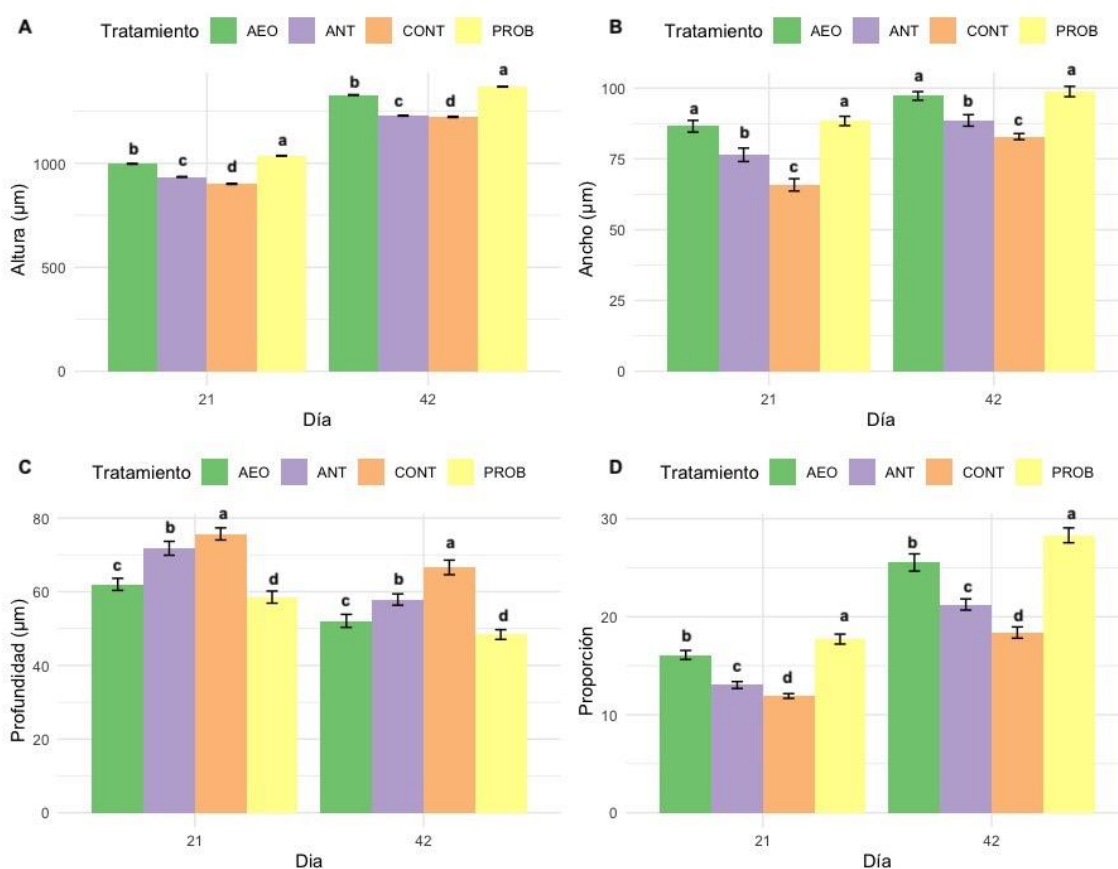
Parámetro	Edad	CONT	ANT	PROB	AEO	Valor P
<b>Altura vellosidad.</b>	21 días	901,15 <sup>D</sup>	934,6 <sup>C</sup>	1036,21 <sup>A</sup>	997,41 <sup>B</sup>	< 2 e -16
	42 días	1223,08 <sup>D</sup>	1228,7 <sup>C</sup>	1368,11 <sup>A</sup>	1328,58 <sup>B</sup>	< 2 e -16
<b>Ancho vellosidad.</b>	21 días	65,81 <sup>C</sup>	76,49 <sup>B</sup>	88,38 <sup>A</sup>	86,51 <sup>A</sup>	14 e - 14
	42 días	82,86 <sup>C</sup>	88,56 <sup>B</sup>	98,76 <sup>A</sup>	97,21 <sup>A</sup>	4,44 e -13
<b>Profundidad cripta.</b>	21 días	75,66 <sup>A</sup>	71,76 <sup>B</sup>	58,51 <sup>D</sup>	61,98 <sup>C</sup>	2,02 e - 13
	42 días	66,58 <sup>A</sup>	57,86 <sup>B</sup>	48,36 <sup>D</sup>	52,08 <sup>C</sup>	1,74 e - 13
<b>AV/PC</b>	21 días	11,19 <sup>D</sup>	13,03 <sup>C</sup>	17,71 <sup>A</sup>	16,10 <sup>A</sup>	2,73 e - 16
	42 días	19,38 <sup>D</sup>	21,24 <sup>C</sup>	28,30 <sup>A</sup>	25,53 <sup>A</sup>	9,74 e - 16
(AV/PC) Relación altura vellosidad/profundidad cripta. (CONT): dieta sin la adición de antibiótico, probiótico y AEO. (ANT): dieta control más la adición de antibiótico (Bacitracina de zinc 350 ppm). (PROB) dieta control más la adición de 50 ppm de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> . (AEO): dieta control más la adición de 150 ppm de aceite esencial de orégano (AEO- <i>Lippia organoides</i> ). <sup>A,B,C</sup> Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ).						

Cabe resaltar que un mayor valor en la relación altura de la vellosidad/profundidad de la cripta (AV/PC) hace referencia a vellosidades mas altas con criptas menos profundas. Así, los valores mas altos para AV/PC se encontraron en aquellas aves que recibieron PROB o AEO en la dieta, sin evidencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambos tratamientos.

Sin embargo, el resultado obtenido bajo el uso de antibiótico fue significativamente mas bajo en comparación al uso de *Bacillus subtilis* y AEO.

En la gráfica 1 se puede observar un comportamiento mas detallado de las diferentes variables de morfometría; conjuntamente, se evidencia que la variabilidad entre muestras de un mismo tratamiento fue baja.

**Gráfica 1.** Efecto del uso de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre la morfometría del íleon en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.



**A.** Altura de la vellosidad en µm. **B.** Ancho de la vellosidad en µm. **C.** Profundidad de las criptas en µm. **D.** Relación altura de la vellosidad / Profundidad de la cripta. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). (**CONT**): dieta sin la adición de antibiótico, probiótico y AEO. (**ANT**): dieta control más la adición de antibiótico (Avilamicina 10 ppm). (**AEO**): dieta control más la adición de 150 ppm de aceite esencial de orégano (AEO-*Lippia origanoides*). (**PROB**): dieta control más la adición de *Bacillus subtilis* (en forma de esporas) a razón de 50 ppm.

### 3.3.2. pH Intestinal.

Un resumen de los valores de pH obtenidos en los diferentes tratamientos es presentado en la tabla 3. Es evidente que el pH disminuyó a medida que avanzó la edad de las aves; no obstante,

la distancia estadística de los valores de pH entre los días 21 y 42 para un mismo tratamiento no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

De manera similar no se evidenció diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) para pH entre los diferentes tratamientos; sin embargo, es evidente la presencia de un pH ligeramente más ácido en aquellas aves que recibieron PROB y AEO en comparación al pH intestinal de las aves que recibieron antibiótico.

**Tabla 3.** Efecto del uso de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre el pH del íleon en pollos de engorde a los 21 días y 42 días de edad.

Parámetro	Edad	CONT	ANT	PROB	AEO	Valor P
pH	21 días	7,2 <sup>A,X</sup>	7,13 <sup>A,X</sup>	6,87 <sup>A,X</sup>	6,90 <sup>A,X</sup>	0,18
	42 días	6,94 <sup>A,X</sup>	6,97 <sup>A,X</sup>	6,73 <sup>A,X</sup>	6,78 <sup>A,X</sup>	0,401

(CONT): dieta sin la adición de antibiótico, probiótico y AEO. (ANT): dieta control más la adición de antibiótico (Bacitracina de zinc 350 ppm). (PROB) dieta control más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis*. (AEO): dieta control más la adición de 150 ppm de aceite esencial de orégano (AEO-*Lippia origanoides*). <sup>A,B,C</sup> Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ). <sup>X,Y,Z</sup> Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ).

### 3.4. Discusión.

Los probióticos y extractos de plantas, principalmente los aceites esenciales han sido de gran interés dadas las bondades que aportan sobre algunas funciones biológicas a nivel intestinal tales como: regulación del crecimiento de microorganismos, regulación de la respuesta inmune y protección del epitelio intestinal frente al estrés oxidativo y desarrollo de la morfometría tanto en aves como en cerdos (Liu et al., 2018).

Un estudio de campo realizado por Bai et al. (2018) en el cual se evaluó el efecto de *Bacillus subtilis* sobre la morfología del intestino y la actividad antioxidante sobre el epitelio, encontraron que la adición de 2 a 5 ppm de *Bacillus subtilis* en el alimento de pollos de engorde, mejoró los valores para altura y ancho de las vellosidades, profundidad de criptas y área superficial del intestino delgado en comparación con aves que fueron alimentadas con una dieta comercial. De igual manera, la adición de *Bacillus subtilis* aumentó la capacidad antioxidante del intestino delgado al incrementar la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes como: superoxidasa dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión GH1, lo cual se vio reflejado en una disminución de especies reactivas de oxígeno a nivel intestinal. Resultados similares sobre

la morfología y desarrollo del intestino mediante el uso de *Bacillus subtilis* han sido reportados por Ma et al. (2018) y Reis et al. (2017).

Los resultados encontrados en el presente trabajo evidencian una mayor altura y ancho de las vellosidades en aquellas aves que recibieron *Bacillus subtilis* (gráfica 1A y 1B); es sabido que los probióticos protegen el ambiente del intestino disminuyendo la descamación epitelial mediante el control en el crecimiento de bacterias patógenas ya sea por exclusión competitiva, producción de ácidos orgánicos o bacteriocinas (Gadde et al., 2017), promoviendo la maduración e integridad intestinal, y mejorando el metabolismo por el incremento en la actividad enzimática (Ma et al., 2018; Wu et al., 2018; Gong et al., 2018).

Por su parte, se ha reportado que los compuestos bioactivos de los aceites esenciales estimulan la proliferación y crecimiento de las células epiteliales del tracto gastrointestinal y protegen el tejido intestinal de microorganismos patógenos, dando como resultado una mayor altura de las vellosidades y menor profundidad de las criptas (Sugiharto, 2016). Zou et al. (2016), realizaron estudios en lechones suplementados con AEO, encontrando un mejor desarrollo de la morfología del intestino y un aumento significativo en la expresión de proteínas de unión estrecha (zónula ocludens y ocludinas). No obstante, y de manera similar a los resultados encontrados en el presente estudio, Peng et al. (2016) no encontraron efectos en el uso de AEO sobre la altura de las vellosidades, mientras que la adición de 300 y 600 ppm de AEO disminuyó la profundidad de las criptas y aumentó significativamente la relación altura de vellosidad/profundidad de cripta.

Cabe resaltar que, a medida que las vellosidades se hacen mas altas y anchas, los procesos de digestión y absorción de los nutrientes ocurren de manera más eficiente (Latorre et al., 2017); además, la disminución en la relación altura de vellosidad/profundidad de cripta están relacionadas con una ineficiencia de la función intestinal (Santos et al., 2016); por tanto, conservar la integridad de la vellosidad implica controlar la tasa de descamación de los enterocitos, la cual se ve incrementada principalmente por mala calidad del alimento y las disbiosis de los ecosistemas microbianos intestinales (Wealleans, Sirukhi, & Egorov, 2017; Wilson et al., 2018).

Finalmente, el pH puede ser un factor clave a nivel de íleon para controlar el paso y crecimiento desproporcionado de microorganismos provenientes del tracto posterior, controlando de esta manera la descamación del epitelio intestinal y la hiperactivación del sistema inmune, disminuyendo así el gasto energético y, mejorando la salud y bienestar de las aves (Reis et al., 2017; Poppi et al., 2015). Madrid et al. (2017), reportaron disminuciones en el pH de las diferentes secciones del intestino de pollos de engorde mediante la adición de AEO en la dieta, favoreciendo un pH ácido para el control en la replicación de microorganismos patógenos a nivel

intestinal. Por su parte, ha sido reportada la capacidad de los probióticos de reducir el pH del intestino mediante la producción de ácidos orgánicos y la alteración en la composición de la microbiota, favoreciendo el crecimiento de géneros bacterianos que contribuyen en gran medida a la fermentación de carbohidratos (Qin et al., 2018).

### **3.5. Conclusión.**

Los probióticos y aceites esenciales han demostrado ser una alternativa eficaz para mejorar la salud intestinal y rendimiento productivo en aves de corral. Acorde a los resultados encontrados en la presente investigación, el uso de *Bacillus subtilis* y aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) tienen un efecto positivo sobre la morfometría y el pH del intestino, lo que podría mejorar el ambiente intestinal y el rendimiento productivo en pollos de engorde. Tanto el probiótico como el aceite esencial mostraron efectos superiores a los obtenidos con el antibiótico.

## Bibliografía.

- Arenas, N. E., & Melo, V. M. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática Livestock production and emergency antibiotic resistance in Colombia: Systematic review. *Infectio*, 22(2), 110–119.
- Aviagen. (2017). *Ross 308 AP. Objetivo de rendimiento*.
- Bai, K., Feng, C., Jiang, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, L., & Wang, T. (2018). Dietary effects of *Bacillus subtilis* fmbj on growth performance, small intestinal morphology, and its antioxidant capacity of broilers. *Poultry Science*, 97(7), 2312–2321. <https://doi.org/10.3382/ps/pey116>
- Benavides, J. (2011). Evaluación de la mezcla de un prebiótico y un ácido orgánico en la salud intestinal y parámetros productivos de pollos de engorde. In *Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira- Facultad De Ciencias Agropecuarias: Vol. Primera ed.*
- Birchenough, G. M. H., Dalgakiran, F., Witcomb, L. A., Johansson, M. E. V., McCarthy, A. J., Hansson, G. C., & Taylor, P. W. (2017). Postnatal development of the small intestinal mucosa drives age-dependent, regio-selective susceptibility to *Escherichia coli* K1 infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00123-w>
- Chávez, L., López, A., & Parra, J. (2015). La inclusión de cepas probióticas mejora los parámetros inmunológicos en pollos de engorde. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 160–169.
- Chávez, L., López, A., & Parra, J. (2016). Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos de Zootecnia*, 65(249), 51–58. <https://doi.org/10.21071/az.v65i249.441>
- Chowdhury, S., Mandal, G. P., & Patra, A. K. (2018). Different essential oils in diets of chickens: 1. Growth performance, nutrient utilisation, nitrogen excretion, carcass traits and chemical composition of meat. *Animal Feed Science and Technology*, 236(September 2017), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.002>
- Costa, M. C., Bessegatto, J. A., Alfieri, A. A., Weese, J. S., Filho, J. A. B., & Oba, A. (2017). Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *PLoS ONE*, 12(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171642>
- Cowieson, A. J., & Kluentner, A. M. (2018). Contribution of exogenous enzymes to potentiate the removal of antibiotic growth promoters in poultry production. *Animal Feed Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2018.04.026>
- Fasina, Y. O., Newman, M. M., Stough, J. M., & Liles, M. R. (2016). Effect of *Clostridium perfringens* infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of

- broiler chickens. *Poultry Science*, 95(2), 247–260. <https://doi.org/10.3382/ps/pev329>
- Gadde, U. D., Oh, S., Lee, Y., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2017). Dietary *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials alleviate LPS-induced intestinal immunological stress and improve intestinal barrier gene expression in commercial broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 114, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.004>
- Gong, L., Wang, B., Mei, X., Xu, H., Qin, Y., Li, W., & Zhou, Y. (2018). Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. *Animal Science Journal*, 89(11), 1561–1571. <https://doi.org/10.1111/asj.13089>
- Iclas, C. (2012). *INTERNATIONAL GUIDIN PRINCIPLES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INVOLVING ANIMALS DECEMBER 2012 COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATION OF MEDICAL SCIENCES and THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY AN NIMAL SCIENCE*.
- Itza-Ortiz, M., Segura-Correa, J., Parra-Suescún, J., Aguilar-Urquizo, E., & Escobar-Gordillo, N. (2019). Correlation between body weight and intestinal villi morphology in finishing pigs. *Acta Universitaria*, 29, 1–7. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2354>
- Jayaraman, B., & Nyachoti, C. M. (2017). Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*, 3(3), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.002>
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Vicente, J. L., Wolfenden, R., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2017). Effects of the inclusion of a *Bacillus* direct-fed microbial on performance parameters, bone quality, recovered gut microflora, and intestinal morphology in broilers consuming a grower diet containing corn distillers dried grains with solubles. *Poultry Science*, 96(8), 2728–2735. <https://doi.org/10.3382/ps/pex082>
- Leary, S., Underwood, W., Lilly, E., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Clinic, A. V., Walla, W., Grandin, T., Collins, F., Greenacre, C., Gwaltney-brant, S., Mccrackin, M. A., Polytechnic, V., Meyer, R., State, M., Miller, D., Shearer, J., Yanong, R., ... Division, A. W. (2013a). AVMA Guidelines for euthanasia of animals 2013. In *AVMA Guidelines for euthanasia*. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50009-1>
- Leary, S., Underwood, W., Lilly, E., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Clinic, A. V., Walla, W., Grandin, T., Collins, F., Greenacre, C., Gwaltney-brant, S., Mccrackin, M. A., Polytechnic, V., Meyer, R., State, M., Miller, D., Shearer, J., Yanong, R., ... Division, A. W. (2013b). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals* (2013.0.1). <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50009-1>
- Li, C. L., Wang, J., Zhang, H. J., Wu, S. G., Hui, Q. R., Yang, C. B., Fang, R. J., & Qi, G. H. (2019). Intestinal morphologic and microbiota responses to dietary *Bacillus* spp. in a broiler



- chicken model. *Frontiers in Physiology*, *10*(JAN), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01968>
- Li, H., Cheng, J., Yuan, Y., Luo, R., & Zhu, Z. (2020). Age-related intestinal monosaccharides transporters expression and villus surface area increase in broiler and layer chickens. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Vol. 104, Issue 1, pp. 144–155).  
<https://doi.org/10.1111/jpn.13211>
- Li, R. X., Li, J., Zhang, S. Y., Mi, Y. L., & Zhang, C. Q. (2018). Attenuating effect of melatonin on lipopolysaccharide-induced chicken small intestine inflammation. *Poultry Science, March*. <https://doi.org/10.3382/ps/pey084>
- Liu, S., Song, M., Yun, W., Lee, J., Lee, C., Kwak, W., Han, N., Kim, H., & Cho, J. (2018). Effects of oral administration of different dosages of carvacrol essential oils on intestinal barrier function in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, April*, 1257–1265. <https://doi.org/10.1111/jpn.12944>
- Liu, Y., Espinosa, C. D., Abelilla, J. J., Casas, G. A., Lagos, L. V., Lee, S. A., Kwon, W. B., Mathai, J. K., Navarro, D. M. D. L., Jaworski, N. W., & Stein, H. H. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Animal Nutrition*, *4*(2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.007>
- Lokapirnasari, W. P., Dewi, A. R., Fathinah, A., Hidanah, S., Harijani, N., Soeharsono, Karimah, B., & Andriani, A. D. (2017). Effect of probiotic supplementation on organic feed to alternative antibiotic growth promoter on production performance and economics analysis of quail. *Veterinary World*, *10*(12), 1508–1514. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1508-1514>
- Ma, Y., Wang, W., Zhang, H., Wang, J., Zhang, W., Gao, J., Wu, S., & Qi, G. (2018). Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens. *Scientific Reports*, *8*(1), 15358. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33762-8>
- Madrid-Garcés, T. A., López-Herrera, A., & Parra-Suescún, J. E. (2018). Archivos de zootecnia. *Archivos de Zootecnia*, *67* (260)(0), 470–476.
- Madrid Garcés, T. A., Parra Suescún, J. E., & López Herrera, A. (2017). La ingesta de aceite esencial de orégano (*Lippia organoides*) mejora la morfología intestinal en Broilers. *Archivos de Zootecnia*, *66*(254), 287–299. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21071/az.v66i254.2334>
- María Barrera-Barrera, Paola Rodríguez-González, & Giovanni Torres-Vidales. (2014). Efectos de la adición de ácido cítrico y un probiótico comercial en el agua de bebida, sobre la morfometría del duodeno y parámetros zootécnicos en pollo de engorde. *ORINOQUIA - Universidad de Los Llanos - Villavicencio, Meta, Colombia., Vol. 18-No 2*, 52–62.
- Marion, J., Biernat, M., Thomas, F., Savary, G., Le Breton, Y., Zabielski, R., Le Huërou-Luron,

- I., & Le Dividich, J. (2002). Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. effects of level of energy intake. *Reproduction, Nutrition, Development*, 42(4), 339–354.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M. P., Gaucher, M. Lou, Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
- Moeser, A. J., Pohl, C. S., & Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition*, 3(4), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003>
- Mohammadi Gheisar, M., & Kim, I. H. (2018). Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), 92–99. <http://10.0.4.56/1828051X.2017.1350120>
- Muhammad, J., Khan, S., Su, J. Q., Hesham, A. E. L., Ditta, A., Nawab, J., & Ali, A. (2019). Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. In *Journal of Soils and Sediments*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02360-0>
- Oviedo-Rondón, E. O. (2019). Holistic view of intestinal health in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 250(December 2017), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.009>
- Peng, Q. Y., Li, J. D., Li, Z., Duan, Z. Y., & Wu, Y. P. (2016). Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 214, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>
- Poppi, L. B., Rivaldi, J. D., Coutinho, T. S., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. P., Mancilha, I. M., Poppi, L. B., Rivaldi, J. D., Coutinho, T. S., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. P., & Mancilha, I. M. (2015). Effect of Lactobacillus sp. isolates supernatant on Escherichia coli O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(4), 353–359. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000400007>
- Qaisrani, S. N., Moquet, P. C. A., van Krimpen, M. M., Kwakkel, R. P., Verstegen, M. W. A., & Hendriks, W. H. (2014). Protein source and dietary structure influence growth performance, gut morphology, and hindgut fermentation characteristics in broilers. *Poultry Science*, 93(12), 3053–3064. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04091>
- Qin, C., Gong, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, B., Li, Y., & Li, W. (2018). Effect of Saccharomyces boulardii and Bacillus subtilis B10 on gut microbiota modulation in broilers. *Animal Nutrition*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.004>

- Reis, M. P., Fassani, E. J., Garcia, A. A. P., Rodrigues, P. B., Bertechini, A. G., Barrett, N., Persia, M. E., & Schmidt, C. J. (2017). Effect of *Bacillus subtilis* (DSM 17299) on performance, digestibility, intestine morphology, and pH in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 26(4), 573–583. <https://doi.org/10.3382/japr/pfx032>
- Rocha, P. M. C., Barros, M. E. G., & Evêncio-Neto, J. (2016). Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(4), 312–316. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000400010>
- Rodolfo, J., Rossi, A. S., Cella, P., Narváez-solarte, S. P., Groff, E. H., Takahashi, P. M., & Endo, S. (2016). Probióticos y simbióticos en el rendimiento y la morfometría intestinal de pollos de engorde desafiados con *Salmonella enteritidis* ( Probiotics and symbiotic about performance and intestinal morphometry of broilers challenged with *Salmonella enteritidis* ). *Revista Electronica de Veterinaria*, 17(1695–7504), 1–16.
- SAS/STAT® Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute. (2017). *SAS® SAS/STAT User's Guide, Version 14.3th Ed. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2017.*
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>
- Vente-Spreuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Koninkx, J. F. J. G., Beynen, A. C., & Verstegen, M. W. A. (2004). Dietary protein hydrolysates vs. the intact proteins do not enhance mucosal integrity and growth performance in weaned piglets. *Livestock Production Science*, 85(2–3), 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00132-5)
- Wang, L., Zhu, F., Yang, H., Li, J., Li, Y., Ding, X., Xiong, X., & Yin, Y. (2019). Effects of dietary supplementation with epidermal growth factor on nutrient digestibility, intestinal development and expression of nutrient transporters in early-weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(2), 618–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.13059>
- Wang, M., Yang, C., Wang, Q., Li, J., Huang, P., Li, Y., Ding, X., Yang, H., & Yin, Y. (2020). The relationship between villous height and growth performance, small intestinal mucosal enzymes activities and nutrient transporters expression in weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(2), 606–615. <https://doi.org/10.1111/jpn.13299>
- Wealleans, A. L., Sirukhi, M., & Egorov, I. A. (2017). Performance, gut morphology and microbiology effects of a *Bacillus* probiotic, avilamycin and their combination in mixed grain broiler diets. *British Poultry Science*, 58(5), 523–529. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1349298>
- Wilson, F. D., Cummings, T. S., Barbosa, T. M., Williams, C. J., Gerard, P. D., & Peebles, E. D. (2018). Comparison of two methods for determination of intestinal villus to crypt ratios and

documentation of early age-associated ratio changes in broiler. *Poultry Science*, 1757–1761.

Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Peng, J., & Wei, H. (2016). Oregano Essential Oil Improves Intestinal Morphology and Expression of Tight Junction Proteins Associated with Modulation of Selected Intestinal Bacteria and Immune Status in a Pig Model. *BioMed Research International*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/5436738>

# **Capítulo 4: Microbioma en ileon de pollos de engorde suplementados con Aceite Esencial de Orégano (*Lippia Origanoides*) y *Bacillus subtilis* como alternativas al uso de APC.**

## **4.1. Introducción.**

El descubrimiento de los antibióticos en las primeras décadas del siglo XX y la reducción de su costo a causa de la producción a gran escala, revolucionó la producción animal a partir de la década de 1940 cuando se introdujo el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación de aves y cerdos principalmente (Lekagul et al., 2019). Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) han demostrado mejorar considerablemente los procesos de digestión y absorción de los nutrientes presentes en la dieta, debido a que modulan la microbiota intestinal, previenen la colonización del intestino por agentes patógenos y disminuyen la inflamación del epitelio (Fasina et al., 2016; Kabpoy et al., 2016).

Sin embargo, en los últimos años se han aumentado las acciones para reducir o eliminar los APC de la alimentación animal, dado el aumento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos en los productos finales de producción, lo cual representa un riesgo para la salud humana (Lillehoj et al., 2018; Nhung et al., 2017). Entre las nuevas iniciativas frente al uso de APC se ha destacado el desarrollo e investigación de aditivos alternativos, eficaces y seguros que permitan mejorar el rendimiento productivo y la salud de los animales (Gadde et al., 2017); dentro de estos productos se destaca el uso de aceites esenciales y probióticos, ya que tienen la capacidad de modular la microbiota y mejorar la salud intestinal (Mohammadi-Gheisar & Kim, 2018; Nhung et al., 2017).

El microbioma intestinal de las aves está formado por ecosistemas diversos que establecen relaciones complejas con el hospedador (Clavijo & Flórez, 2018). Es sabido que el microbioma juega un papel importante en la salud y el bienestar del hospedador, por lo que el establecimiento de microorganismos beneficiosos y un adecuado balance bacteriano desde los primeros días del ave es crucial para el desarrollo óptimo del intestino, una buena salud y un mejor desempeño productivo (Dou et al., 2017; Zeng et al., 2017). Lo anterior es de suma importancia, ya que la microbiota intestinal provee al ave de diversos beneficios como: mejorar la capacidad fermentación de carbohidratos complejos y extracción de energía de la dieta; aumentar la producción de ácidos grasos volátiles y vitaminas; y disminuir los efectos nocivos de microorganismos patógenos (Postler & Ghosh, 2017; Iljazovic et al., 2020).

En general, la pérdida de diversidad en el microbioma produce cambios en el balance entre microorganismos comensales beneficiosos y microorganismos potencialmente patógenos (patobiontes), lo cual trae consigo alteraciones en la producción de metabolitos microbianos (Iljazovic et al., 2020). Estudios realizados bajo modelos animales, evidencian que los cambios en la producción de ácidos grasos volátiles como consecuencia de una disbiosis o el crecimiento de algunas especies bacterianas consideradas nocivas, desencadenan alteraciones en la respuesta inmune sistémica y contribuyen al desarrollo de enfermedades intestinales (Escalante et al., 2016; Makki et al., 2018; Seo et al., 2015).

Son diversos los factores que tienen efecto en la estructuración de la microbiota intestinal, dentro de los cuales la dieta y sus componentes son factores muy importantes; ya que diversos estudios han reportado que los componentes del alimento tales como: fibra, proteína, minerales y aditivos alimentarios desempeñan un efecto importante en la modulación del microbioma (Chen et al., 2016; Starke et al., 2014).

Aditivos nutricionales como los prebióticos sirven como fuente de energía para las bacterias beneficiosas intestinales, además de mejorar la supervivencia de las cepas probióticas cuando son suministradas de forma conjunta como simbióticos (Guevarra et al., 2019). En consecuencia, los probióticos ayudan a acidificar el pH intestinal, estimulan el sistema inmunológico e inhiben el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos mediante exclusión competitiva y la producción de sustancia antimicrobianas (Chae et al., 2016; Guevarra et al., 2019).

Por su parte, los aceites esenciales poseen compuestos activos como los polifenoles que pueden modular la respuesta inmune y a su vez, tienen efecto bactericida, alterando la membrana celular de las bacterias y causando su muerte, lo cual reduce la proliferación de microorganismos patógenos y favorece el crecimiento de microorganismos funcionales a nivel intestinal al disminuir la ocupación y competencia por nutrientes (Mohammadi-Gheisar & Kim, 2018)(Abouelezz et al., 2019).

Así, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto en la adición de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre la riqueza, diversidad y composición de los ecosistemas microbianos de íleon en pollos de engorde.

## **4.2. Materiales y métodos.**

### **4.2.1. Consideraciones éticas**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

#### **4.2.2. Localización**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

#### **4.2.3. Animales**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

#### **4.2.4. Manejo Sanitario**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

#### **4.2.5. Dietas**

Remitirse a capítulo 3 página 46.

#### **4.2.6. Buenas Prácticas de Eutanasia para toma de muestras**

Remitirse a capítulo 3 pagina 46.

#### **4.2.7. Secuenciación con tecnología Illumina de amplicones de regiones hipervariables del gen 16S rRNA generados desde ADN metagenómico y flujo de análisis bioinformático para determinación de estructura y diversidad de microbiomas**

Para el proceso de secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA se siguió el siguiente proceso:

- 1) Se tomaron 0.5 g de contenido ileal utilizados para la extracción y purificación de ADN metagenómico mediante el kit FastDNA SPIN, siguiendo las especificaciones del fabricante.
- 2) El ADN metagenómico total extraído de cada muestra fue analizado evidenciando presencia e integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa y, cantidad y pureza evaluada espectrofotométricamente.
- 3) Las secuencias parciales del gen 16S ARNr fueron amplificadas a partir de 10 ng de ADN metagenómico, usando primers que tienen como objetivo la región V4 de la secuencia del gen 16S ARNr (515 forward 5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA - 3'; 909 reverse 3'- CCCCXYCAATTCMTTTRAGT- 5') (Bohorquez et al., 2012) (Burbach et al., 2016)(Wang et

al., 2018). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación inicial de 95 °C por 2 minutos seguido por 4 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, alineamiento de primers a 60°C por 30 segundos y en ciclos con “touchdown” de -2°C por ciclo y extensión a 68°C por 30 segundos, y seguido por 26 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 53°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 30 segundos, con una extensión final a 68°C por 7 minutos. Las librerías de amplicones fueron construidas para ser compatibles con secuenciación Illumina paired-end de acuerdo a protocolos reportados (Milici *et al.*, 2016).

#### **4.2.8. Análisis bioinformático.**

Los análisis de identificación y control de calidad de las secuencias contenidas en los archivos fastq se realizaron por medio de la plataforma QIIME 2 (Kuczynski *et al.*, 2011). Las secuencias quiméricas fueron identificadas, extraídas y excluidas de los conjuntos de datos por medio de Usearch 6.1. Posteriormente, se identificaron las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) que presentaron un 97% de similitud con las secuencias reportadas en el GenBank. Aquellas OTUs que no coincidieron con ninguna secuencia reportada en dicha base de datos fueron reagrupadas, remuestreadas y recomparadas nuevamente con respecto a las secuencias del GENBANK con el fin de minimizar el número de secuencias excluidas (Mancabelli *et al.*, 2016). Finalmente, aquellas secuencias representativas de cada OTU fueron seleccionadas y clasificadas taxonómicamente utilizando la plataforma QIIME 2. Durante este proceso, aquellas OTU con alta identidad con respecto a las secuencias reportadas en el GENBANK (> 97%) fueron agrupadas en la misma OTU y se reportaron en el nivel más bajo de identificación taxonómica común a todas las secuencias (Ellis *et al.*, 2016).

#### **4.2.9. Análisis estadístico.**

Los análisis de diversidad beta se realizaron por medio de un análisis de componentes principales (PCoA) bajo el cálculo de distancias Bray - Curtis mediante la función Vegdist del paquete Vegan del software R (Costa *et al.*, 2017). Con el fin de determinar el efecto de la dieta sobre la composición de los ecosistemas bacterianos a nivel de íleon, se utilizaron las funciones Adonis y Anosim del paquete Vegan para realizar un análisis permutacional multivariado (PERMANOVA) y de similitud (ANOSIM) respectivamente. Finalmente, mediante el paquete phyloseq de R, se estructuró un archivo physeq para llevar a cabo los análisis de diversidad alfa y composición taxonómica. Así, por medio de la función plot\_richness y diversity se calculó la riqueza y uniformidad de los ecosistemas bacterianos bajo el índice de Shannon y Simpson, y con el uso de las funciones subset\_taxa y plot\_bar se evaluó la abundancia relativa de los principales taxones bajo los cuales fueron clasificadas las diferentes muestras (Gomez *et al.*, 2016).

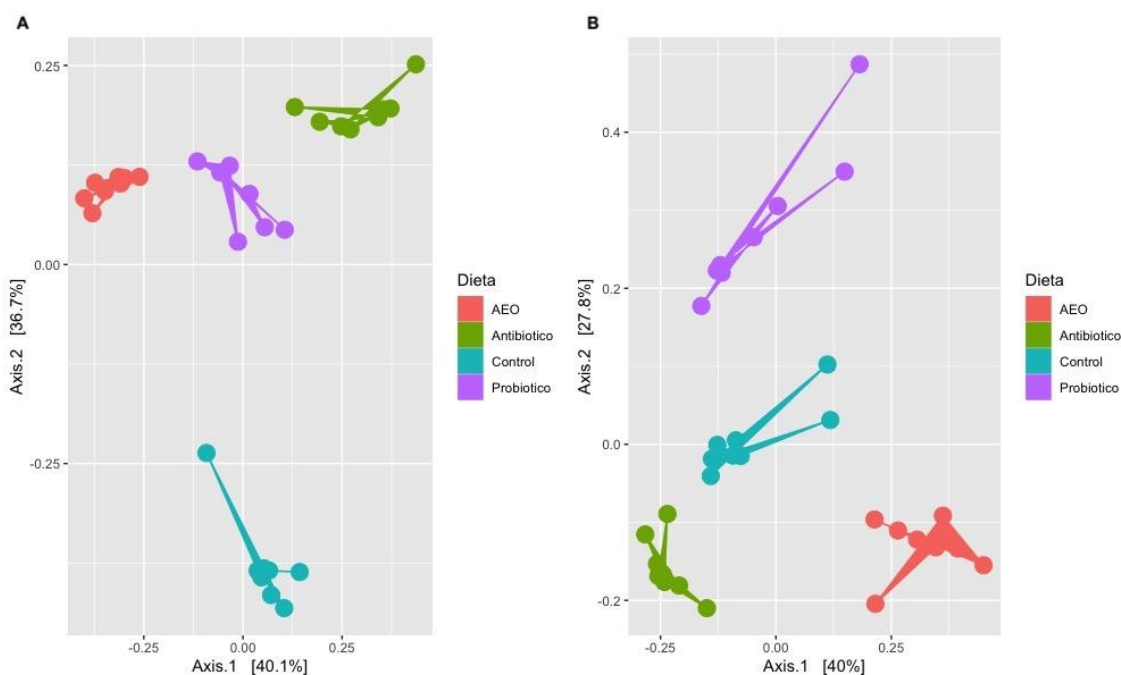


### 4.3. Resultados.

Luego de realizar el filtro de calidad y eliminación de secuencias quiméricas de los resultados obtenidos del proceso de secuenciación, se obtuvo un promedio de  $22.036 \pm (9736)$  lecturas por muestra de contenido ileal en las aves que recibieron los diferentes tratamientos.

Al evaluar la diversidad beta, se encontró la capacidad de los diferentes aditivos utilizados para modificar los ecosistemas microbianos del íleon en las aves a los días 21 y 42. En las gráficas 2A y 2B se presenta una gráfica de componentes principales (PcoA) en el cual se evidencia la disimilitud calculada a partir de distancias Bray - Curtis de los ecosistemas bacterianos del íleon evaluados en términos de taxones que comparten mas de un 97% de similitud con respecto a la secuencia de ADN del gen 16S ARNr. En la gráfica 2A se puede observar la disimilitud de los ecosistemas al día 21, donde hay una mayor similitud entre los microbiomas de las aves que recibieron antibiótico, AEO y probiótico (*Bacillus subtilis*) con respecto al tratamiento control; sin embargo, no se observa un acercamiento significativo representado por un corte entre puntos de diferentes tratamientos que asegure una similitud estadísticamente significativa entre al menos un par de dichos tratamientos. Por su parte, en la gráfica 2B se observa la disimilitud entre los diferentes microbiomas al día 42; de igual manera, no se observa una similitud significativa entre ninguno de los tratamientos; no obstante, es evidente un mayor distanciamiento entre el microbioma de las aves que recibieron *Bacillus subtilis* con respecto a los demás tratamientos.

**Gráfica 2.** Efecto de AEO (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre la variabilidad en la composición taxonómica de la microbiota ileal en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.



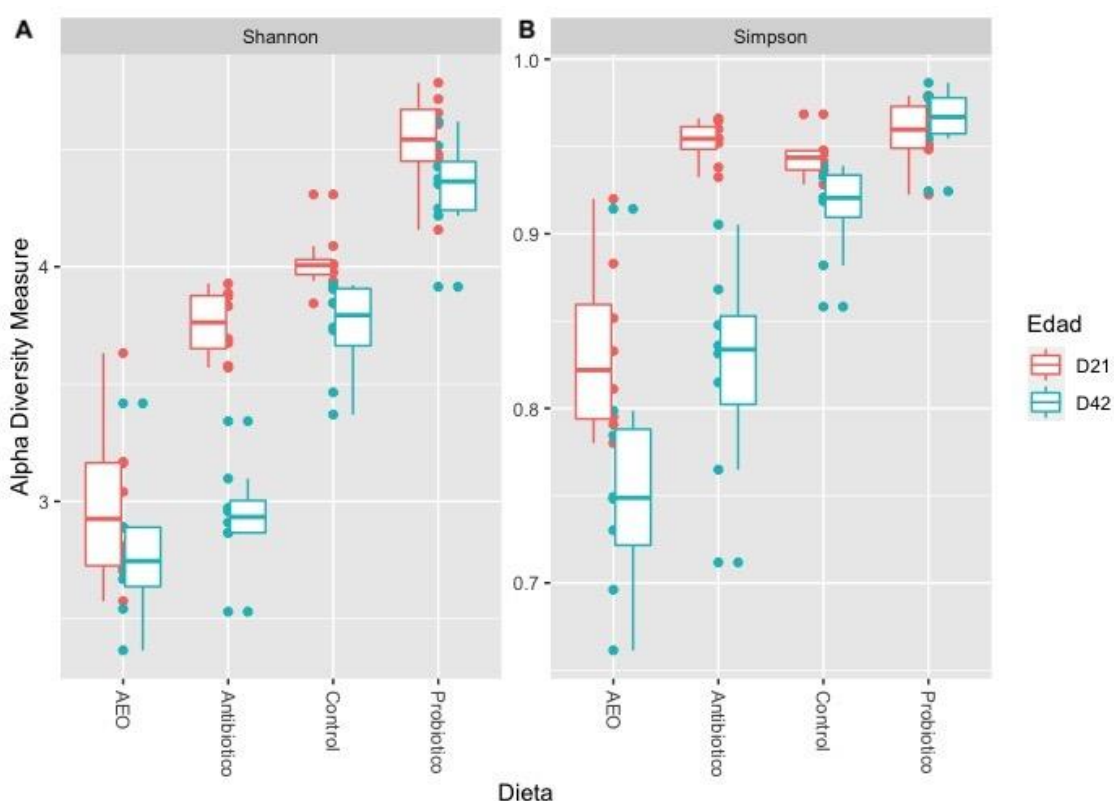
Análisis de componentes principales (PcoA) a partir de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con un 97% de similitud a la secuencia del gen 16S RNAr basado en distancias Bray - Curtis, mostrando diferencias significativas en la composición del microbioma ileal de pollos de engorde alimentados con diferentes dietas **A.** Composición del microbioma ileal día 21 de edad. **B.** Composición del microbioma ileal día 42 de edad. **“Control”:** Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul); **“Antibiótico”:** Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color verde claro); **“AEO”:** Dieta 3 (AEO): DB más la adición de 150ppm de AEO (color salmón); **“Probiótico”:** Dieta 4 (PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color purpura).

Los resultados obtenidos por análisis de componentes principales (PcoA) fueron corroborados mediante un análisis de similitud (ANOSIM) entre las comunidades bacterianas de los diferentes tratamientos a una misma edad ( $R= 0,97$  y  $R= 0,99$  para los días 21 y 42 respectivamente). De igual manera, los resultados anteriores indican una mayor similitud entre individuos de un mismo tratamiento y una menor similitud entre tratamientos. Es importante resaltar que valores de  $R$  cercanos a 1 para el análisis ANOSIM, indican una mayor similitud entre individuos de un mismo tratamiento que entre individuos de diferentes tratamientos.

Al realizar un análisis de varianza permutacional multivariado (PERMANOVA), se encontró que el uso de aditivos en la dieta afecta de manera significativa ( $p < 0.001$ ) la composición de la microbiota ileal. Así, la variabilidad en la composición de la microbiota asociada a la adición de aditivos en la dieta fue de  $R^2= 0,7332$ , mientras que la variabilidad asociada a la edad fue de  $R^2= 0,053$

Por su parte, los resultados en los análisis diversidad alfa, basados en la riqueza y uniformidad de las comunidades bacterianas encontradas en íleon se presenta en las gráficas 3A y 3B. Se puede observar que el uso de *Bacillus subtilis* favorece el crecimiento de ecosistemas más ricos y uniformes tanto al día 21 y 42 en comparación al uso de AEO, bajo el cual se disminuyó la diversidad de los ecosistemas del íleon. No obstante, es importante resaltar que el uso de antibiótico afecta considerablemente la riqueza de los microbiomas intestinales conforme avanza la edad de las aves. Aunque el uso de antibiótico y AEO disminuye la riqueza microbiana, cabe resaltar que la uniformidad de dichos ecosistemas es relativamente estable (gráfica 3B) puesto los valores obtenidos estuvieron alejados de cero, lo cual indica una baja probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a una misma especie (baja probabilidad de dominancia de una o pocas especies).

**Gráfica 3.** Efecto de la suplementación con AEO (*Lippia Origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre la riqueza y uniformidad de los ecosistemas microbianos a nivel de íleon en pollos a los días 21 y 42 de edad.

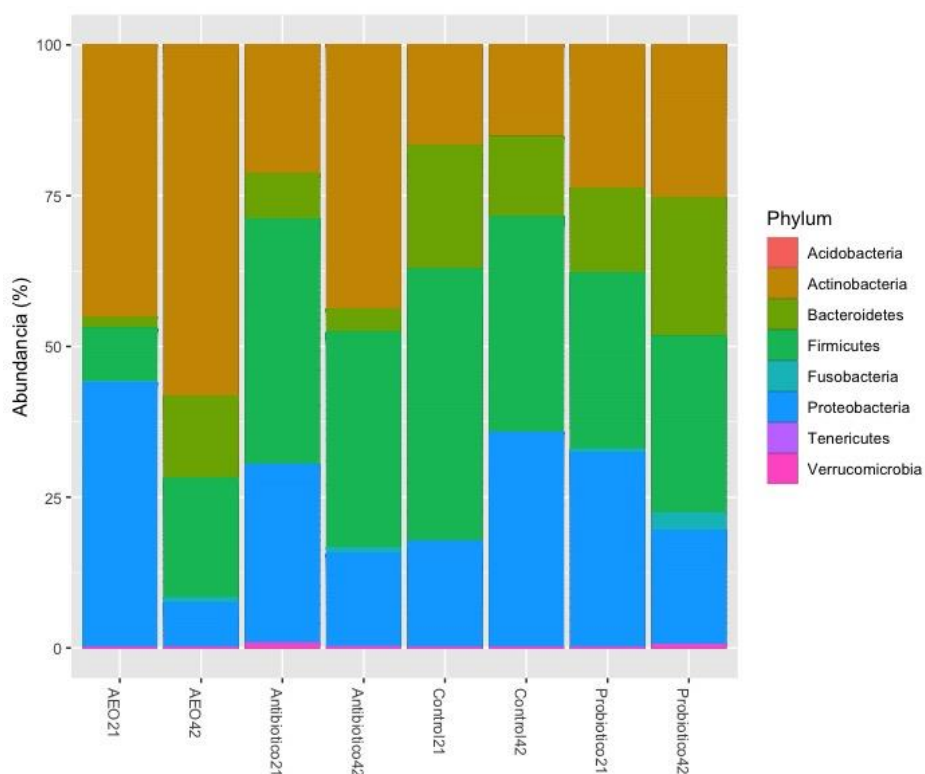


Riqueza y uniformidad del microbioma ileal bajo el índice de Shannon (A) y Simpson (B) calculados a partir de unidades taxonómicas (OTUS) que comparten 97% de similitud con la secuencia del gen 16S RNAr, en pollos de engorde a la edad de 21 y 42 días, suplementados con aceite esencial de orégano (AEO) o *Bacillus subtilis* o Avilamicina como antibiótico promotor de crecimiento. “Control”: Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul); “Antibiótico”: Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color verde claro); “AEO”: Dieta 3 (AEO): DB más la

adición de 150ppm de AEO (color salmón); “**Probiótico**”: Dieta 4 (PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color púrpura).

La proporción de filos bacterianos que conforman el microbioma ileal obtenido bajo las diferentes dietas se presenta en la gráfica 4. En general, las aves que recibieron los tratamientos control, antibiótico y probiótico presentaron una alta proporción de *Firmicutes* en comparación a los resultados obtenidos con la adición de AEO donde los filos dominantes fueron *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Así mismo, se observa una alta proporción de *Proteobacteria* en los diferentes microbiomas y en menor proporción los filos *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, a excepción de este último que presentó una mayor abundancia bajo el uso de AEO. Respecto a los *Bacteroidetes*, es evidente que el uso de probiótico favoreció su crecimiento, mientras que AEO permitió el crecimiento de una proporción significativa al final del periodo experimental con respecto al día 21.

**Gráfica 4.** Abundancia relativa de filos bacterianos a nivel de íleon en pollos alimentados con APC o *Bacillus subtilis* o AEO a los 21 y 42 días de edad.

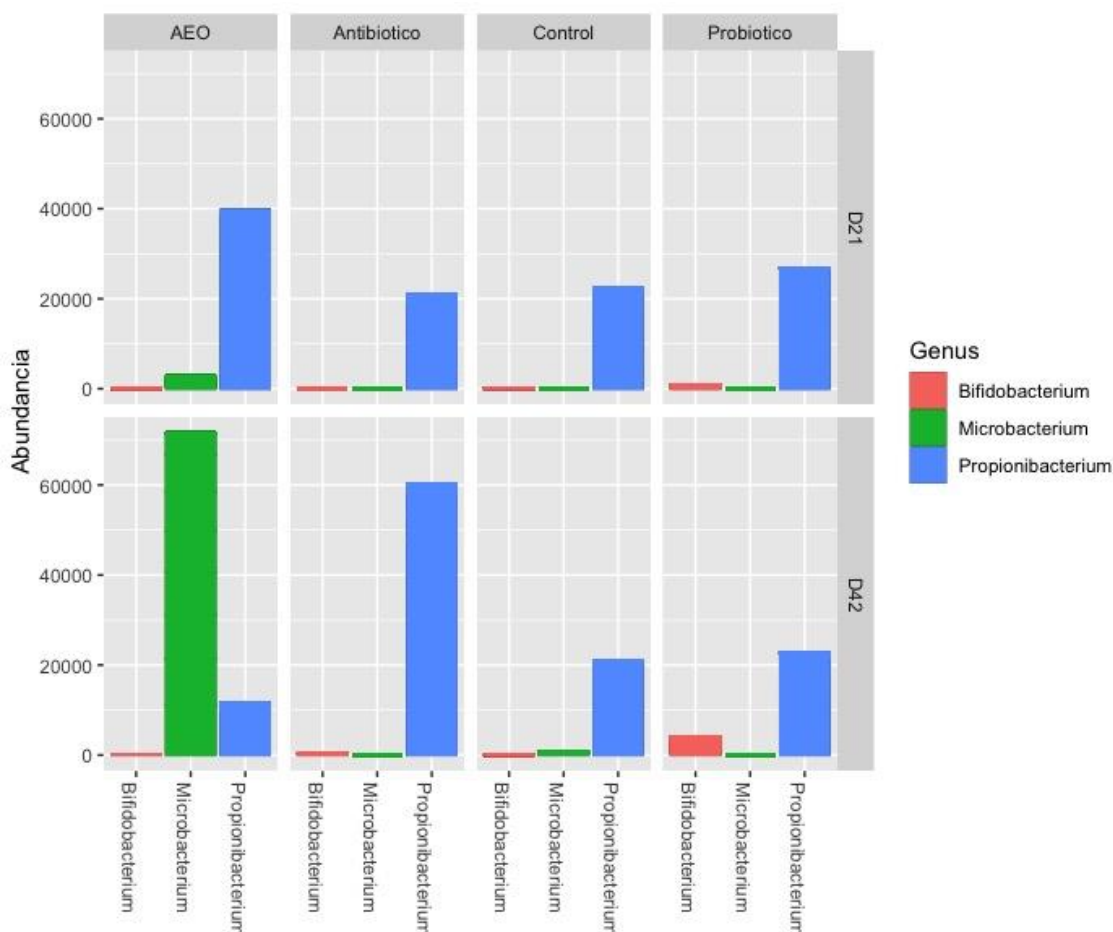


Abundancia relativa de los principales filos encontrados en las muestras de contenido ileal en pollos de engorde a la edad de 21 y 42 días, suplementados con *Bacillus subtilis* o aceite esencial de orégano (AEO) o Avilamicina (APC). “**Control**”: Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul); “**Antibiótico**”: Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color

verde claro); “AEO”: Dieta 3 (AEO): DB más la adición 150ppm de AEO (color salmón); “Probiótico”: Dieta 4 (PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color purpura). “21”- “42”: edad de toma de muestras.

En la gráfica 5 se presentan los géneros más abundantes del filo de las Actinobacterias. El género *Propionibacterium* estuvo presente en todas las muestras evidenciándose una mayor proporción al día 21 en las aves que recibieron AEO y un aumento significativo al día 42 con respecto al día 21 en las aves que recibieron antibiótico. No obstante, se encontró una población significativa de *Microbacterium* al día 42 en las aves que recibieron AEO y una disminución de *Propionibacterium* con respecto al día 21.

**Gráfica 5.** Efecto de la suplementación con APC o *Bacillus subtilis* o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo de las Actinobacterias en pollos de engorde. a los 21 y 42 días de edad.

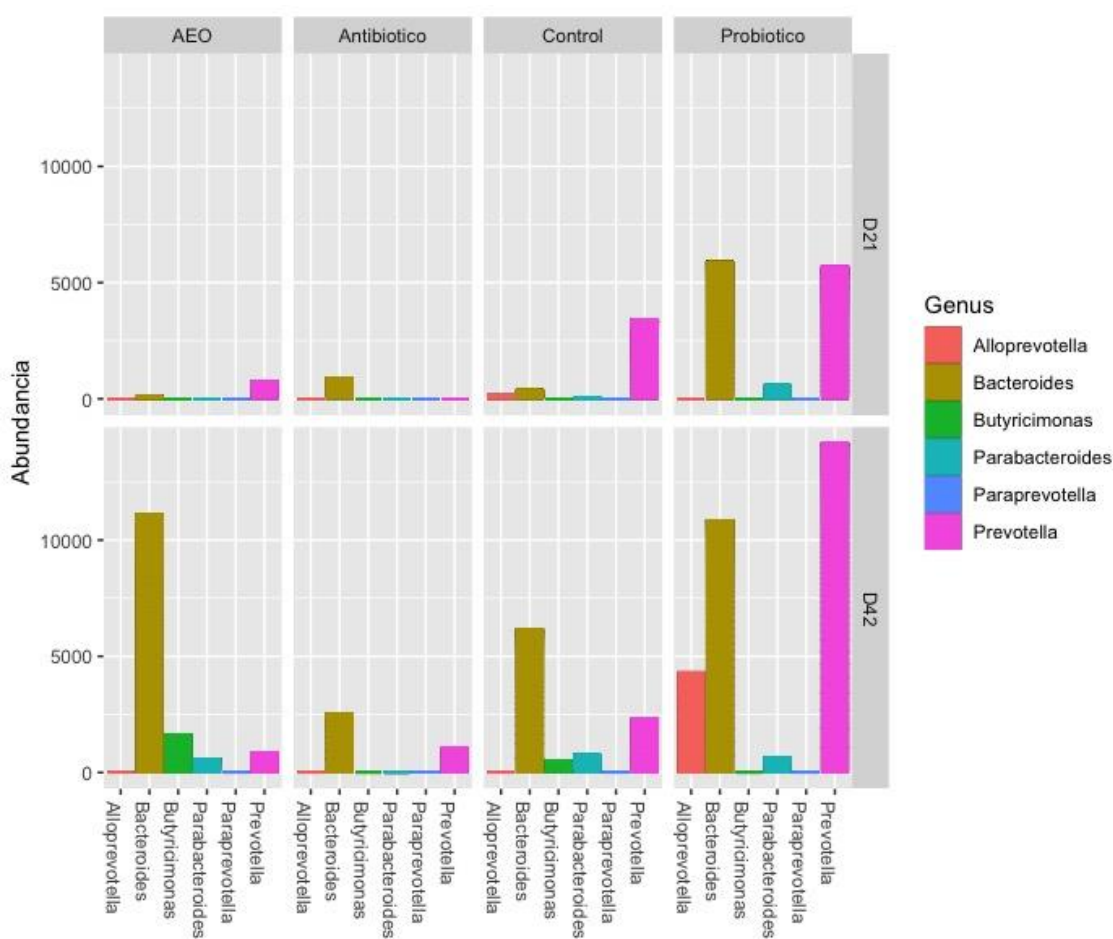


“Control”: Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul); “Antibiótico”: Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color verde claro); “AEO”: Dieta 3 (AEO): DB más la adición de 150ppm de AEO (color salmón); “Probiótico”: Dieta 4

(PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color púrpura). “21”-“42”: edad de toma de muestras.

Con respecto al filo de los *Bacteroidetes* se pueden observar los resultados obtenidos en la gráfica 6 para cada uno de los géneros hallados en mayor abundancia. En general, *Bacteroides* y *Prevotella* fueron los géneros más abundantes. Tanto al día 21 y 42, el uso de *Bacillus subtilis* favoreció el crecimiento de ambos géneros, encontrando las poblaciones más altas al día 42, además de una población significativa de *Alloprevotella*. Por su parte, al día 21, el uso de AEO no favoreció el crecimiento significativo de géneros de *Bacteroidetes*; no obstante, se encontró una población significativa de *Bacteroides* al día 42 y en menor proporción de *Butyrivimonas* y *Prevotella*. El uso de antibiótico no favoreció el crecimiento de manera significativa de los géneros anteriormente mencionados.

**Gráfica 6.** Efecto de la suplementación con APC o *Bacillus subtilis* o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo de los Bacteroidetes en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.



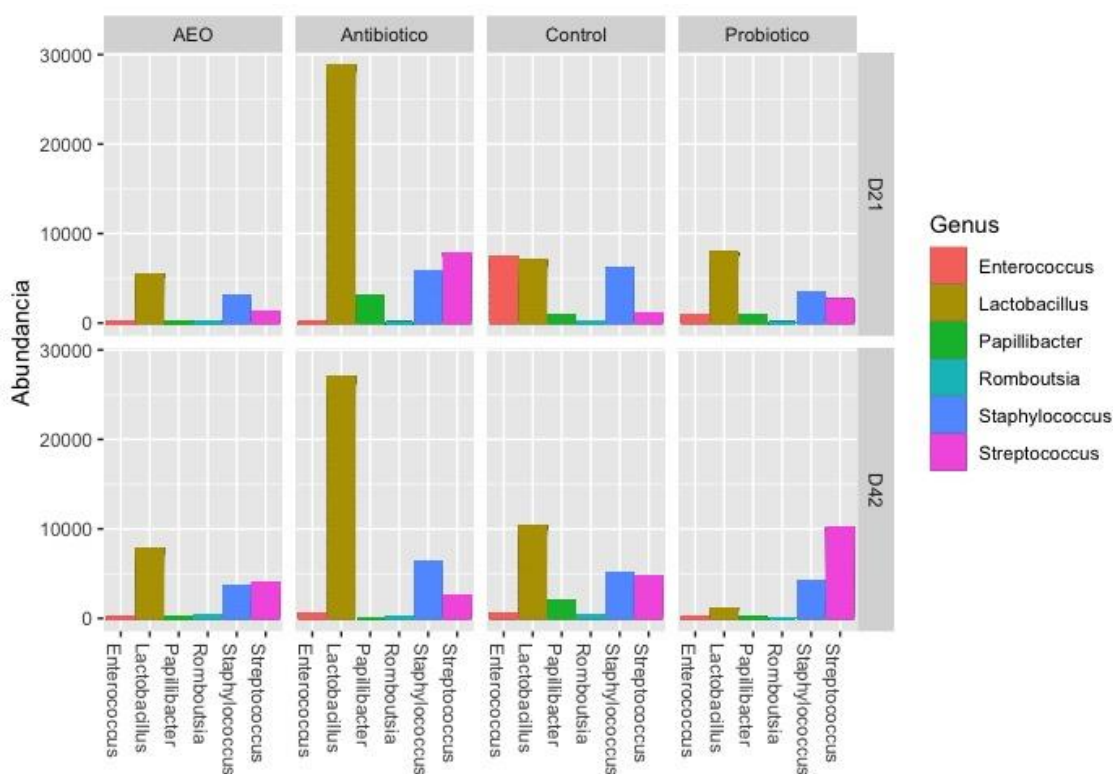
“Control”: Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul);

“Antibiótico”: Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color verde claro);

“AEO”: Dieta 3 (AEO): DB con 150ppm de AEO (color salmón); “Probiótico”: Dieta 4 (PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color purpura). “21”-“42”: edad de toma de muestras.

En la gráfica 7 se presentan los géneros del filo de los *Firmicutes* encontrados de manera mas representativa en las muestras evaluadas. Es evidente que el uso de antibiótico permitió el crecimiento de poblaciones de *Lactobacillus* de manera significativa a nivel de íleon. Mientras que poblaciones menos numerosas de *Staphylococcus* y *Streptococcus* fueron encontradas en los demás tratamientos.

**Gráfica 7.** Efecto de la adición de APC o *Bacillus subtilis* o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo Firmicutes en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.

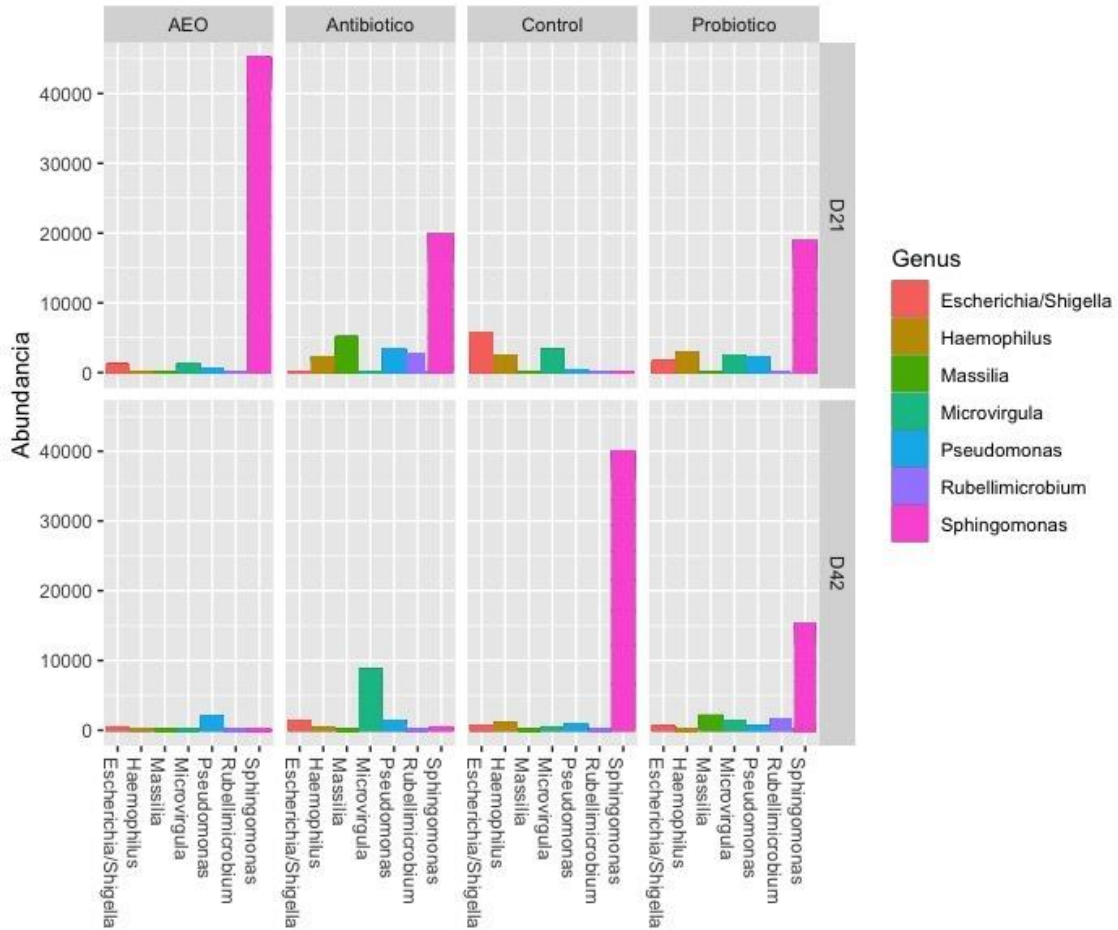


“Control”: Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul); “Antibiótico”: Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color verde claro); “AEO”: Dieta 3 (AEO): DB más la adición de 150ppm de AEO (color salmón); “Probiótico”: Dieta 4 (PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color purpura). “21”-“42”: edad de toma de muestras.

Finalmente, los géneros dentro de las *Proteobacterias* son presentados en la gráfica 8. El género de las *Sphingomonas* fue el más representativo, presentando una alta abundancia al día 21 bajo el uso de AEO y al día 42 en las aves alimentadas con la dieta control; sin embargo, una abundancia

relativamente menor se evidencia tanto al día 21 y 42 bajo el uso de *Bacillus subtilis* y al día 21 bajo el uso de APC.

**Gráfica 8.** Efecto de la suplementación con APC o *Bacillus subtilis* o AEO sobre la abundancia de géneros bacterianos clasificados en el filo Proteobacterias en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.



“Control”: Dieta Basal DB (D1): sin la adición de antibiótico, AEO y *Bacillus subtilis* (color azul);  
 “Antibiótico”: Dieta 2 (ANT): DB más la adición de antibiótico (Avilamicina) (color verde claro);  
 “AEO”: Dieta 3 (AEO): DB más la adición de 150ppm de AEO (color salmón); “Probiótico”: Dieta 4 (PROB): DB más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis* (Color púrpura). “21”- “42”: edad de toma de muestras.

#### 4.4. Discusión.

Las investigaciones realizadas en los últimos años sobre el microbioma intestinal han acumulado evidencia que indica que el microbioma juega un papel importante sobre el metabolismo de los



nutrientes, la utilización de la energía y la salud de los animales. Así, el microbioma se ha considerado un componente clave en el desempeño productivo de los animales (Maltecca et al., 2019); sin embargo, factores como la dieta juegan un papel clave sobre la modificación de las comunidades microbianas a lo largo del tracto gastrointestinal (Kers et al., 2018).

La adición de AEO y *Bacillus subtilis* (Probiótico) en la dieta proporcionaron un crecimiento mayor de poblaciones de *Bacteroidetes* al final del periodo experimental en comparación a la dieta con antibiótico, además de una disminución en la proporción de *Firmicutes* por parte de ambos tratamientos. De manera similar, Chen et al., (2020) encontró que el suministro de aceites esenciales en la dieta incrementan de manera significativa la abundancia relativa de *Bacteroidetes* y disminuyen la abundancia de *Firmicutes* y del género *Lactobacillus* en la microbiota cecal de pollos de engorde. Sin embargo, en el mismo estudio Chen et al. (2020), halló que la adición de aceite esencial aumentó los índices de diversidad alfa (Chao 1 y Shannon) en comparación al grupo tratado con antibiótico (Virginiamicina). En contraposición, los índices de diversidad alfa obtenidos en el presente estudio evidencian una disminución significativa en la diversidad alfa a nivel ileal de los pollos que recibieron AEO en comparación al grupo tratado con antibiótico (ver gráfica 3). Al respecto Yin et al. (2017), sugiere que los compuestos fenólicos como el timol y carvacrol disminuyen la riqueza microbiana del intestino en pollos de engorde dado su efecto bactericida. Además, los resultados de diversidad beta mediante análisis de componentes principales (PcoA) muestran diferencias en el modo de acción del AEO y el antibiótico sobre la modulación del microbioma ileal (ver gráfica 2).

Los extractos de plantas han mostrado un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, ya que pueden contrarrestar el crecimiento bacteriano a causa de su hidrofobicidad y alta concentración de compuestos fenólicos, lo cual causa disrupción en la funcionalidad de la membrana y alteración de la homeostasis celular (Liu et al., 2018; Zhai et al., 2018).

Se ha reportado que la adición de polifenoles en la dieta de pollos incrementa las poblaciones de *Prevotella*, *Megamonas* y *Bacteroides* a nivel intestinal (Brenes et al., 2015); de manera similar, el tratamiento con AEO favoreció un crecimiento significativo del genero *Bacteroides* al día 42 en comparación al tratamiento con antibiótico, aunque no se evidenció crecimiento de *Prevotella* en ambos tratamientos. Sin embargo, *Bacillus subtilis* favoreció el crecimiento de *Prevotella*, *Alloprevotella* y *Bacteroides* tanto al día 21 y 42.

Una pequeña población de *Butyricimonas* fue hallada al día 42 bajo la adición de AEO, mientras que los demás tratamientos no estimularon su crecimiento. La producción de butirato por bacterias del género *Butyricimonas* puede afectar positivamente la ganancia de peso en terneros (Du et al., 2018) y el peso final de conejos (Fang et al., 2020). Por su parte, poblaciones de *Bacteroides*,

*Ruminococcus* y *Faecalibacterium* a nivel íleon y ciegos están asociadas a un mejor rendimiento productivo en pollos de engorde (Iqbal et al., 2020). De este modo, los géneros *Butyricimonas*, *Prevotella* y *Bacteroides* encontrados bajo el tratamiento con AEO y, mayormente bajo el uso de Probiótico (*Bacillus subtilis*), pueden estar asociados al desarrollo significativamente mayor en la morfometría del intestino obtenida bajo estos dos tratamientos (remitirse al capítulo 3, ver tabla 2) en comparación al tratamiento con antibiótico (ANT).

Wang et al. (2019), reportó que géneros bacterianos de la familia *Ruminococcaceae* y del género *Prevotella* están involucrados en la fermentación de la fibra dietaria y producción de ácidos grasos volátiles a nivel intestinal. Los ácidos grasos de cadena corta principalmente acetato, propionato y butirato han sido reconocidos como metabolitos importantes que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, desarrollo del epitelio del intestino y regulación del metabolismo energético (Priyadarshini et al., 2018).

Por su parte, una disminución en las poblaciones de *Bifidobacteria*, *Prevotellaceae* y aumento en las poblaciones de *E. coli*, *Shigella*, *Aeromonas* y *Microvirgula* en intestino delgado han estado asociadas al síndrome de intestino irritable en humanos. Además, una disminución en la diversidad alfa y el aumento en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* se han asociado al consumo de antibióticos (Bhattarai et al., 2017; Giamarellos-Bourboulis et al., 2015; Kastl et al., 2020). De manera similar a los resultados del presente estudio, se evidenció un aumento en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* en las muestras de microbioma del tratamiento con adición de antibiótico al día 42 con respecto a los demás tratamientos (ver gráfica 7).

Los probióticos permiten modificar el microbioma mediante la producción de ácidos orgánicos y favorecer la salud del intestino. La producción de ácidos orgánicos por bacterias del género *Lactobacillos*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* han mostrado cambios en el microbioma intestinal (Lefevre et al., 2017) (Vitetta et al., 2019). Es evidente que *Bacillus subtilis*, modificó el microbioma generando una composición en el ecosistema microbiano del íleon diferente a los demás tratamientos (control, antibiótico y AEO); además, los valores mas altos de riqueza en el microbioma de íleon fueron obtenidos mediante la acción de *Bacillus subtilis* en comparación a los resultados obtenidos con AEO y antibiótico (avilamicina). Resultados similares con respecto al efecto de *Bacillus subtilis* sobre la modulación del microbioma intestinal han sido reportados por Qin et al. (2018) y Jacquier et al. (2019).

Finalmente, el crecimiento del género *Sphingomonas* ha mostrado beneficios en la regulación del estado inflamatorio del intestino inducido por las células T y NK. Estudios realizados en ratones libres de gérmenes con inflamación intestinal inducida por la sobreexpresión de células NK se vio normalizada bajo la colonización del intestino por parte de *Sphingomonas* (Wingender et al., 2012). En el presente trabajo fue evidente la capacidad de *Bacillus subtilis* para favorecer el

crecimiento de *Sphingomonas* tanto al día 21 como 42 en el íleon de los pollos, mientras que el uso de AEO o antibiótico presentaron una población representativa solo al día 21.

#### **4.5. Conclusión.**

El uso de AEO (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* evidencian un modo de acción diferente sobre la modulación del microbioma del íleon en comparación al antibiótico promotor de crecimiento (avilamicina); no obstante, *Bacillus subtilis* mostró un efecto favorable al incrementar significativamente la diversidad del microbioma ileal. Además, ambos aditivos favorecieron el crecimiento de géneros bacterianos, principalmente: *Bacteroides*, *Prevotella* y *Sphingomonas* que han demostrado tener un efecto favorable sobre la salud del intestino y el rendimiento productivo. Sin embargo, para establecer un mejor entendimiento del microbioma obtenido bajo los diferentes tratamientos y su relación con la salud del intestino, es indispensable el desarrollo de estudios que involucren disciplinas como la metagenómica y la metabolómica.

## Bibliografía.

- Abouelezz, K., Abou-Hadied, M., Yuan, J., Elokil, A. A., Wang, G., Wang, S., Wang, J., & Bian, G. (2019). Nutritional impacts of dietary oregano and Enviva essential oils on the performance, gut microbiota and blood biochemicals of growing ducks. *Animal*. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000508>
- Bhattarai, Y., Muniz Pedrogo, D. A., & Kashyap, P. C. (2017). Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *312*(1), G52–G62. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00338.2016>
- Bohorquez, L. C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., Baena, S., & Zambrano, M. M. (2012). In-depth Characterization via Complementing Culture-Independent Approaches of the Microbial Community in an Acidic Hot Spring of the Colombian Andes. *Microbial Ecology*, *63*(1), 103–115. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9943-3>
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2015). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, *211*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
- Burbach, K., Seifert, J., Pieper, D. H., & Camarinha-Silva, A. (2016). Evaluation of DNA extraction kits and phylogenetic diversity of the porcine gastrointestinal tract based on Illumina sequencing of two hypervariable regions. *MicrobiologyOpen*, *5*(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/mbo3.312>
- Chae, J. P., Pajarillo, E. A. B., Oh, J. K., Kim, H., & Kang, D.-K. (2016). Revealing the combined effects of lactulose and probiotic enterococci on the swine faecal microbiota using 454 pyrosequencing. *Microbial Biotechnology*, *9*(4), 486–495. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12370>
- Chen, H., Chen, D. W., Qin, W., Liu, Y., Che, L., Huang, Z., Luo, Y., Zhang, Q., Lin, D., Liu, Y., Han, G., DeSmet, S., & Michiels, J. (2016). Wheat bran components modulate intestinal bacteria and gene expression of barrier function relevant proteins in a piglet model. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *68*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1212817>
- Chen, Y., Wang, J., Yu, L., Xu, T., & Zhu, N. (2020). Microbiota and metabolome responses in the cecum and serum of broiler chickens fed with plant essential oils or virginiamycin. *Scientific Reports*, *10*(1), 16–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60135-x>
- Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, *97*(3), 1006–1021. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>

- Costa, M. C., Bessegatto, J. A., Alfieri, A. A., Weese, J. S., Filho, J. A. B., & Oba, A. (2017). Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171642>
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huèrou-Luron, I. L. E., & Abdennebi-Najar, L. (2017). Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169851>
- Du, R., Jiao, S., Dai, Y., An, J., Lv, J., Yan, X., Wang, J., & Han, B. (2018). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the gut microbiota of growth-retarded beef calves. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02006>
- Ellis, J. C., Ballou, A. L., Hassan, H. M., Koci, M. D., Croom, W. J., Ali, R. A., & Mendoza, M. A. (2016). Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, *3*(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00002>
- Escalante, N. K., Lemire, P., Cruz Tleugabulova, M., Prescott, D., Mortha, A., Streutker, C. J., Girardin, S. E., Philpott, D. J., & Mallewaey, T. (2016). The common mouse protozoa *Tritrichomonas muris* alters mucosal T cell homeostasis and colitis susceptibility. *The Journal of Experimental Medicine*, *213*(13), 2841–2850. <https://doi.org/10.1084/jem.20161776>
- Fang, S., Chen, X., Ye, X., Zhou, L., Xue, S., & Gan, Q. (2020). Effects of Gut Microbiome and Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Finishing Weight of Meat Rabbits. *Frontiers in Microbiology*, *11*(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01835>
- Fasina, Y. O., Newman, M. M., Stough, J. M., & Liles, M. R. (2016). Effect of *Clostridium perfringens* infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of broiler chickens. *Poultry Science*, *95*(2), 247–260. <https://doi.org/10.3382/ps/pev329>
- Gadde, U., Kim, W., Oh, S., & Lillehoj, H. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal Health Research Reviews*, *18*, 1–20. <https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- Giamarellos-Bourboulis, E., Tang, J., Pylaris, E., Pistiki, A., Barbatzas, C., Brown, J., Lee, C., Harkins, T., Kim, G., Weitsman, S., Barlow, G., Funari, V., & Pimentel, M. (2015). Molecular assessment of differences in the duodenal microbiome in subjects with irritable bowel syndrome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *50*. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1027261>
- Gomez, A., Rothman, J. M., Petrzekova, K., Yeoman, C. J., Vlckova, K., Umaña, J. D., Carr, M.,

- Modry, D., Todd, A., Torralba, M., Nelson, K. E., Stumpf, R. M., Wilson, B. A., Blekhan, R., White, B. A., & Leigh, S. R. (2016). Temporal variation selects for diet-microbe co-metabolic traits in the gut of Gorilla spp. *ISME Journal*, *10*(2), 514–526. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.146>
- Guevarra, R. B., Lee, J. H., Lee, S. H., Seok, M. J., Kim, D. W., Kang, B. N., Johnson, T. J., Isaacson, R. E., & Kim, H. B. (2019). Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 1–10.
- Iljazovic, A., Roy, U., Gálvez, E. J. C., Lesker, T. R., Zhao, B., Gronow, A., Amend, L., Will, S. E., Hofmann, J. D., Pils, M. C., Schmidt-Hohagen, K., Neumann-Schaal, M., & Strowig, T. (2020). Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunology*, September 2019. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0296-4>
- Iqbal, Y., Cottrell, J., Suleria, H., & Dunshea, F. (2020). Gut Microbiota-Polyphenol Interactions in Chicken: A Review. *Animals*, *10*, 1391. <https://doi.org/10.3390/ani10081391>
- Jacquier, V., Nelson, A., Jlali, M., Rhayat, L., Brinch, K. S., & Devillard, E. (2019). *Bacillus subtilis* 29784 induces a shift in broiler gut microbiome toward butyrate-producing bacteria and improves intestinal histomorphology and animal performance. *Poultry Science*, *98*(6), 2548–2554. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps/pey602>
- Kabpoy, K., Bunyapraphatsara, N., & Phumala, N. (2016). Original Article Effect of Antibiotic Growth Promoters on Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities in Broiler Chickens. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, *46*(1), 89–95.
- Kastl, A. J., Terry, N. A., Wu, G. D., & Albenberg, L. G. (2020). The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cmgh*, *9*(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., & Smidt, H. (2018). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Frontiers in Microbiology*, *9*(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00235>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2011). Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. In *Current Protocols in Bioinformatics: Vol. Chapter 10* (p. Unit 10.7.). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., Simon, R., Pélerin, F., Jüsten, P., & Urdaci, M. C. (2017). Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *83*, 54–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.010>
- Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., & Yeung, S. (2019). Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, *7*(March), 100058.

- <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>
- Li, Y., Fu, X., Ma, X., Geng, S., Jiang, X., & Huang, Q. (2018). *Intestinal Microbiome-Metabolome Responses to Essential Oils in Piglets*. 9(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01988>
- Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M. E., Chi, F., Cravens, R. L., Oh, S., & Gay, C. G. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary Research*, 49(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0562-6>
- Liu, Y., Espinosa, C. D., Abelilla, J. J., Casas, G. A., Lagos, L. V., Lee, S. A., Kwon, W. B., Mathai, J. K., Navarro, D. M. D. L., Jaworski, N. W., & Stein, H. H. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Animal Nutrition*, 4(2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.007>
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host and Microbe*, 23(6), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- Maltecca, C., Bergamaschi, M., & Tiezzi, F. (2019). The interaction between microbiome and pig efficiency: A review. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 137. <https://doi.org/10.1111/jbg.12443>
- Mancabelli, L., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Viappiani, A., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2016). Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4727–4738. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13363>
- Milici, M., Tomasch, J., Wos-Oxley, M. L., Wang, H., Jáuregui, R., Camarinha-Silva, A., Deng, Z.-L., Plumeier, I., Giebel, H.-A., Wurst, M., Pieper, D. H., Simon, M., & Wagner-Döbler, I. (2016). Low diversity of planktonic bacteria in the tropical ocean. *Scientific Reports*, 6(1), 19054. <https://doi.org/10.1038/srep19054>
- Mohammadi Gheisar, M., & Kim, I. H. (2018). Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), 92–99. <http://10.0.4.56/1828051X.2017.1350120>
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(AUG), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- Postler, T., & Ghosh, S. (2017). Understanding the Holobiont: How microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Physiology & Behavior*, 26(1), 110–130. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.008>. Understanding
- Priyadarshini, M., Kotlo, K. U., Dudeja, P. K., & Layden, B. T. (2018). Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *Comprehensive Physiology*,

- 8(3), 1065–1090. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170050>
- Qin, C., Gong, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, B., Li, Y., & Li, W. (2018). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. *Animal Nutrition*, 4(4), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.004>
- Rist, V., Weiss, E., Sauer, N., Mosenthin, R., & Eklund, M. (2013). Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets. *Anaerobe*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.10.003>
- Seo, S.-U., Kamada, N., Muñoz-Planillo, R., Kim, Y.-G., Kim, D., Koizumi, Y., Hasegawa, M., Himpfl, S. D., Browne, H. P., Lawley, T. D., Mobley, H. L. T., Inohara, N., & Núñez, G. (2015). Distinct Commensals Induce Interleukin-1 $\beta$  via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury. *Immunity*, 42(4), 744–755. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.004>
- Starke, I. C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J., & Vahjen, W. (2014). The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2), 416–427. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12233>
- Vitetta, L., Llewellyn, H., & Oldfield, D. (2019). Gut Dysbiosis and the Intestinal Microbiome: *Streptococcus thermophilus* a Key Probiotic for Reducing Uremia. *Microorganisms*, 7(8), 228. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080228>
- Wang, F., Men, X., Zhang, G., Liang, K., Xin, Y., Wang, J., Li, A., Zhang, H., Liu, H., & Wu, L. (2018). Assessment of 16S rRNA gene primers for studying bacterial community structure and function of aging flue-cured tobaccos. *AMB Express*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0713-1>
- Wang, J., Liu, Y., Yang, Y., Bao, C., & Cao, Y. (2019). High level expression of an acidic thermostable xylanase in *Pichia pastoris* and its application in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 98. <https://doi.org/10.1093/jas/skz364>
- Wingender, G., Stepniak, D., Krebs, P., Lin, L., McBride, S., Wei, B., Braun, J., & Mazmanian, S. (2012). Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice. *Gastroenterology*, 143, 418–428. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.017>
- Yin, D., Du, E., Yuan, J., Gao, J., Wang, Y. L., Aggrey, S. E., & Guo, Y. (2017). Supplemental thymol and carvacrol increases ileum *Lactobacillus* population and reduces effect of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in chickens. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07420-4>
- Zeng, M., Inohara, N., & Núñez, G. (2017). *Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut* (Issues 1935-3456 (Electronic)).
- Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., & Kluever, A. M. (2018). Potential of essential oils for



poultry and pigs. *Animal Nutrition*, 4(2), 179–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>

# **Capítulo 5: Variables zootécnicas y su relación con la morfometría intestinal y el microbioma en pollos de engorde suplementados con AEO (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* como alternativas al uso de APC.**

## **5.1. Introducción.**

Uno de los principales objetivos en los sistemas de producción animal es mantener una alta eficiencia en la tasa de crecimiento y utilización de los nutrientes (Medina et al., 2014). Los sistemas de producción avícolas se han caracterizado por mantener ciclos cortos de producción y una alta eficacia en la transformación del alimento en proteína (alcanzando valores de 1.4 - 1.8 en la tasa de conversión alimenticia), convirtiéndola en una de las proteínas más económicas del mercado a nivel mundial (Wahyono & Utami, 2018).

En comparación al valor económico de las carnes rojas (carne de bovinos), la carne de pollo se ha caracterizado por un valor económico más accesible a los consumidores (Wahyono & Utami, 2018), logrando que los productos derivados de la avicultura sean catalogados actualmente como unos de las más importantes fuentes de proteína de origen animal. Por lo anterior, “Se espera que para el año 2020 el consumo de carne de pollo sea mayor que el consumo de carne de cerdo, y se incremente un 27% más para el año 2023” (Tan et al., 2018). Para obtener un rápido crecimiento en el consumo de carne de pollo, se requiere de una mayor eficiencia de los animales, además de una mayor calidad del producto.

De acuerdo al departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA), las grandes producciones de pollo de engorde a nivel mundial se encuentran principalmente en Estados Unidos, representando más del 20% de la producción mundial, seguido de Brasil, la Unión Europea y China (Rama & Singh, 2019). Por su parte, Colombia ocupa el cuarto lugar en América Latina (Milford et al., 2019; Mottet & Tempio, 2017), cerrando el año 2019 con un volumen de producción de 1.693.178 toneladas (FENAVI 2020).

Actualmente las aves se crían bajo condiciones que las hacen susceptibles a problemas de estrés, incrementando los desbalances en la composición de su microbiota intestinal, lo que conlleva a la aparición de desórdenes digestivos frecuentes y disminución del rendimiento productivo

(Blajman et al., 2015). Los antibióticos adicionados en pequeñas dosis (subterapéuticas) en el alimento balanceado han mostrado disminuir los desordenes digestivos asociados a los desbalances microbianos y mejorar el aprovechamiento de los nutrientes (Salim et al., 2018) (Kogut et al., 2017).

Sin embargo, el uso de antibióticos en la alimentación animal ha sido visto en los últimos años como un factor de riesgo para la salud humana, por la selección de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas, generando problemas relacionados con la salud pública (Hrnčár et al., 2016; Muhammad et al., 2019). La resistencia bacteriana ha pasado de ser una amenaza para convertirse en una realidad de gran preocupación que conduce a la implementación de cambios drásticos en los actuales patrones de uso de los antibióticos, así como de nuevas alternativas para su innovación (García-Sánchez et al., 2020).

Las plantas aromáticas han sido ampliamente estudiadas y utilizadas culturalmente con fines culinarios y medicinales; no obstante, algunas de ellas son fuente de compuestos bioactivos, que han venido siendo estudiados dado sus beneficios en el ámbito de la producción animal (Stashenko et al., 2014). El género *Lippia* comprende cerca de 200 especies aromáticas (Linde et al., 2016), cuyo material vegetal posee gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, dando lugar a diferentes clasificaciones de quimiotipos, en cuyos extractos y aceites esenciales se han encontrado propiedades antifúngicas, antioxidantes y antibacterianas (Stashenko et al., 2014). En los últimos años, se ha propuesto aprovechar las propiedades benéficas del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides*), dado su potencial bactericida y antioxidante, además de su capacidad para modular la salud e integridad intestinal (vellosidades), mejorando las variables productivas en los animales (Betancourt et al., 2019; Patiño et al., 2019; Madrid et al., 2017).

Por su parte, los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades suficientes confieren beneficios a la salud del hospedador (Kuritza et al., 2014). En los últimos años, las formulaciones de probióticos han sido desarrolladas y estandarizadas tanto para el consumo en humanos como en animales (Elshagabee et al., 2017). Los probióticos han sido ampliamente suministrados en avicultura, ya que han mostrado beneficios en la prevención de enfermedades gastrointestinales y mejoras sobre el rendimiento productivo (Sugiharto et al., 2017). Actualmente las preparaciones de probióticos están conformadas por especies del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*; sin embargo, especies probióticas de *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bacillus* han sido generalmente reconocidas como seguras (GRAS) (Lefevre et al., 2017). El uso de *Bacillus subtilis* como probióticos ha generado recientemente gran interés ya que tienen la capacidad de formar esporas resistentes a las altas temperaturas y variaciones de pH que les permite sobrevivir a la acidez del estómago, además de aportar efectos benéficos al hospedador como: estimulación del sistema inmune, modulación de

la microbiota intestinal y regulación de la microestructura (vellosidades) intestinal (Cheng et al., 2019; Rhayat et al., 2019).

El objetivo de la presente investigación consistió en evaluar el efecto en el uso de AEO (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* como alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento sobre el desempeño productivo de pollos de engorde y su relación con el desarrollo de la morfometría intestinal y el microbioma.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Consideraciones éticas**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

### **5.2.2. Localización**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

### **5.2.3. Animales**

Se utilizaron 196 pollos machos de línea genética ROSS308 de un día de nacidos y alojados en corrales en piso, con las condiciones de densidad de una producción comercial, de los cuales 144 pollos para evaluar parámetros de rendimiento productivo. La cría de las aves se llevó a cabo siguiendo los procedimientos comerciales: cinco horas antes de la llegada de los pollitos, las criadoras fueron encendidas con la finalidad de precalentar el galpón y alcanzar una temperatura promedio de 32°C al momento de la recepción de los mismos (Aviagen, 2017) en una granja experimental. Las aves recibieron agua y alimento a voluntad durante todo el periodo experimental el cual tuvo una duración de 42 días.

### **5.2.4. Manejo Sanitario**

Remitirse a capítulo 3 página 45.

### **5.2.5. Dietas**

Remitirse a capítulo 3 página 46.

### **5.2.6. Parámetros de desempeño animal**

Dentro de los parámetros zootécnicos se evaluaron: Peso corporal semanal, peso final, ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA) (Li et al., 2019). Los parámetros se evaluaron los días 21 y 42.

Conversión alimenticia acumulada (CA)

$$CA = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Peso ganado}}$$

Ganancia de peso acumulada (GAP):

$$GAP = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

### **5.2.7. Buenas prácticas de eutanasias para toma de muestras**

Remitirse a capítulo 3 página 46.

### **5.2.8. Análisis de morfometría intestinal de muestras**

Remitirse a capítulo 3 página 47.

### **5.2.9. Análisis del PH intestinal**

Remitirse a capítulo 3 página 48.

### **5.2.10. Diseño experimental y análisis estadístico.**

Para el análisis de las variables productivas se realizó un modelo de medidas repetidas en el tiempo bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamiento y tres repeticiones (12 pollos por repetición); donde cada tratamiento representó una de las dietas descritas anteriormente. Cada uno de los animales fue asignado aleatoriamente a una de las cuatro dietas y se registró el peso de los pollos los días 21 y 42. El análisis estadístico se realizó según el procedimiento Proc Mixed del SAS®. PROC MIXED del SAS® software, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2017) (SAS/STAT® Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute., 2017). Las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron determinadas por mínimos cuadrados y analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA). El análisis de comparaciones múltiples entre medias de cada tratamiento se llevó a cabo mediante una prueba de Tuckey para detectar significancia (p

< 0.05) entre medias. Finalmente, mediante el método de Pearson se analizó la correlación entre las variables productivas y la morfometría del intestino.

### 5.3. Resultados.

El rendimiento productivo de los pollos de engorde sometidos a las diferentes dietas es presentado en la tabla 4. En general, las aves que recibieron *Bacillus subtilis* en la dieta presentaron un peso final significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en comparación a los demás tratamientos; por su parte, el uso de AEO mejoró de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la ganancia de peso en comparación a las aves que recibieron avilamicina como antibiótico promotor de crecimiento (APC) en la dieta, mientras que la ausencia de antimicrobianos (dieta control) generó un rendimiento significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en comparación a los demás tratamientos.

Los pollos de engorde que recibieron *Bacillus subtilis* y AEO no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la tasa de conversión alimenticia; sin embargo, el uso de *Bacillus subtilis* y AEO mejoraron significativamente la conversión del alimento ( $p < 0.05$ ) en comparación a los que recibieron APC. No obstante, la adición de APC mejoró de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la tasa de conversión alimenticia en comparación a la dieta control. El comportamiento descrito anteriormente con respecto a la tasa de conversión alimenticia para las diferentes dietas fue similar en ambas edades.

Por su parte, el consumo de alimento no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las diferentes dietas a los 21 días; sin embargo, para el día 42, las aves que recibieron AEO y *Bacillus subtilis* presentaron un consumo significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en comparación a aquellos que recibieron la dieta control y la dieta con APC.

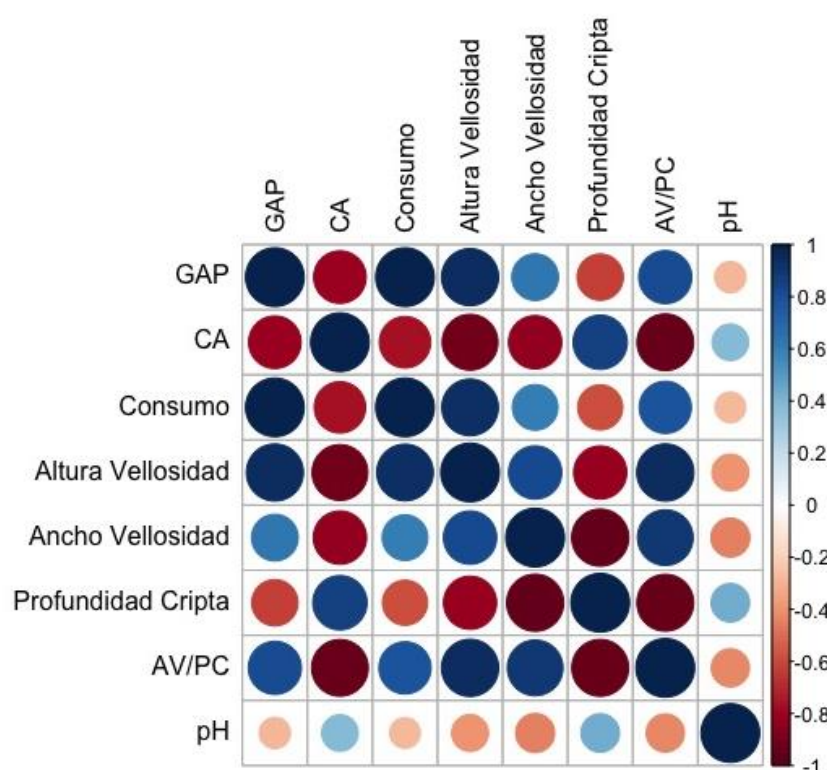
**Tabla 4.** Efecto del uso de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) y *Bacillus subtilis* sobre el rendimiento productivo en pollos de engorde a los 21 y 42 días de edad.

Parámetro	Edad	CONT	ANT	PROB	AEO	Valor P
<b>GAP (g).</b>	21 días	588,42 <sup>B</sup>	596,04 <sup>B</sup>	619,25 <sup>A</sup>	614,70 <sup>A</sup>	< 2 e -16
	42 días	2808,81 <sup>D</sup>	2873,86 <sup>C</sup>	2910 <sup>A</sup>	2895,26 <sup>B</sup>	< 2 e -16
<b>Conversión alimenticia.</b>	21 días	1,61 <sup>A</sup>	1,59 <sup>B</sup>	1,55 <sup>C</sup>	1,54 <sup>C</sup>	14 e - 14
	42 días	1,52 <sup>A</sup>	1,49 <sup>B</sup>	1,42 <sup>C</sup>	1,41 <sup>C</sup>	4,44 e -13
<b>Consumo (g).</b>	21 días	947,57 <sup>A</sup>	947,59 <sup>A</sup>	953,76 <sup>A</sup>	957,97 <sup>A</sup>	2,73 e - 16
	42 días	4282,87 <sup>A</sup>	4294,52 <sup>A</sup>	4130,62 <sup>B</sup>	4122,19 <sup>B</sup>	9,74 e - 16

Ganancia acumulada de peso (GAP). (CONT): dieta sin la adición de antibiótico, probiótico y AEO. (ANT): dieta control más la adición de antibiótico (Bacitracina de zinc 350 ppm). (PROB) dieta control más la adición de 50 ppm de esporas de *Bacillus subtilis*. (AEO): dieta control más la adición de 150ppm de aceite esencial de orégano (*AEO-Lippia origanoides*).  
<sup>A,B,C</sup> Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ).

En la gráfica 9 se presenta una correlación entre las variables zootécnicas y la morfometría del intestino, donde se evidencia una correlación alta y positiva entre el desarrollo de las vellosidades y la ganancia aparente de peso (GAP), mientras que la correlación entre la profundidad de las criptas y la GAP se tornó alta y negativa; por su parte, la correlación entre la tasa de conversión alimenticia y la altura de las vellosidades tomó una correlación alta y negativa. Así, a medida que las vellosidades del intestino se hicieron mas altas y anchas, y las criptas fueron menos profundas, se obtuvo una mejor ganancia de peso y una disminución en la tasa de conversión alimenticia. Sin embargo, la variable en estudio pH no evidencia una correlación alta con las demás variables evaluadas.

**Gráfica 9.** Correlación entre el rendimiento zootecnico, la morfometría del intestino y el pH en pollos de engorde.



Correlación entre el rendimiento productivo y la morfometría del intestino en pollos de engorde a la edad de 21 y 42 días, suplementados con *Bacillus subtilis* o aceite esencial de orégano (AEO) o Avilamicina (APC). Círculos más grandes y de color intenso indican una mayor correlación (azul: positivo, rojo: negativo) entre variables. (GAP) Ganancia aparente de peso; (CA) Convesión alimenticia (AV/PC) Relación altura vellosidad/profundidad cripta.

## 5.4. Discusión.

El uso de aceites esenciales y probióticos como alternativa a los APC han mostrado resultados acordes a los obtenidos en la presente investigación donde se evidencia un rendimiento productivo igual o mejor frente al uso de APC, convirtiéndolos en alternativas para el reemplazo de estos últimos en la alimentación animal (Liu et al., 2017).

Al comparar el rendimiento productivo (ganancia de peso y conversión alimenticia) bajo el efecto de *Bacillus subtilis* (PROB) frente al uso de avilamicina (ANT), se evidenció una superioridad en el desempeño productivo mediante la adición del probiótico. Otros estudios han reportado aumentos significativos en la tasa de crecimiento y disminución en la tasa de conversión alimenticia en pollos suplementados con *Bacillus subtilis* (Li et al., 2016; Park et al., 2020; Al-Fataftah & Abdelqader, 2014; Boroojeni et al., 2018). No obstante, Jayaraman, Das, Saini, Roy, & Chatterjee (2017), encontraron que el rendimiento productivo de los pollos alimentados con *Bacillus subtilis* era mayor frente al uso de avilamicina, pero a diferencia de la presente investigación, la tasa de conversión alimenticia no presentó un cambio significativo entre ambos tratamientos ya que el consumo aumentó conforme a la ganancia de peso.

Por su parte, la adición de 150 ppm de AEO en la dieta incrementó significativamente la GAP y disminuyó la CA con respecto al uso de antibiótico (ANT) y al tratamiento control (CONT). De manera similar, estudios realizados por Peng et al., (2016), reportaron mejoras en la ganancia diaria de peso y el peso final de aves que recibieron AEO en comparación a aquellas que recibieron avilamicina como promotor de crecimiento. Sin embargo, Liu et al. (2017) no encontraron diferencias significativas para la ganancia diaria de peso, el peso final y la conversión alimenticia bajo el uso de AEO frente al uso de APC en la dieta. Estas inconsistencias pueden estar relacionadas con diferencias en la composición y nivel de inclusión de los aditivos fitogénicos utilizados, el tipo de dieta y la edad del animal (Sugiharto, 2016).

El incremento en el rendimiento productivo bajo el uso de AEO como aditivo está asociado a diversos factores, principalmente a una mejor digestibilidad de la energía y de los nutrientes presentes en la dieta, y a la disminución de los procesos de inflamación en el intestino (Cheng et al., 2018; Omonijo et al., 2018; Zhai, Liu, Wang, Wu, & Klunter, 2018; Van Der Aar, Molist, & van der Klis, 2017). Por su parte, los probióticos favorecen el rendimiento productivo de las aves, ya que garantizan un equilibrio saludable de la microbiota del intestino, ya sea: mediante la producción de ácidos orgánicos (Gadde et al., 2017) y/o por exclusión competitiva, lo cual disminuye el gasto energético que implica la respuesta inmune (Function, Fab, & Negative, 2017). Estos cambios se asocian a un mejor desarrollo del epitelio intestinal.



Como se resume en la tabla 2 (remitirse al capítulo 3), la adición de AEO y *Bacillus subtilis* (PROB) mejoraron el crecimiento de la vellosidades y disminuyeron la profundización de las criptas intestinales en comparación al tratamiento control (CONT) y al uso de antibiótico (ANT), esto se vio reflejado en el rendimiento productivo, donde el tratamiento PROB y AEO tuvieron un efecto significativamente mayor en comparación al tratamiento ANT. Dicha relación es confirmada en la gráfica 9 donde se observa una correlación alta y positiva entre el crecimiento de las vellosidades intestinales y el desempeño productivo. Es sabido que las vellosidades intestinales son estructuras importantes para la digestión y absorción de los nutrientes. Diversos autores, han planteado la hipótesis que la altura de las vellosidades intestinales está estrechamente relacionada no solo con la digestión, sino además, con la capacidad de absorción (Li et al., 2020; Wang et al., 2019; Wang et al., 2020), por lo cual se dispone de una mayor cantidad de nutrientes para el desarrollo de tejidos, y por ende para el crecimiento de los animales (Li et al., 2016).

Por otra parte, los resultados encontrados en la presente investigación (remitirse al capítulo 4, página 70), muestran que la adición de AEO y *B. subtilis* (PROB) favorecieron el crecimiento de los generos *Prevotella*, *Bacteroides*, y *Butyricimonas*. Se ha reportado que dichos géneros bacterianos están asociados a la producción de ácidos grasos de cadena corta a nivel intestinal y aumento del rendimiento productivo (Fang et al., 2020; Iqbal et al., 2020; Du et al., 2018). De manera similar, la resistencia a la colonización del intestino por parte de bacterias patógenas y la regulación del estado inflamatorio que pueden afectar la tasa de crecimiento de los animales, se ha asociado al crecimiento de bacterias como *Prevotella* y *Sphingomonas*, cuyas poblaciones se vieron favorecidas bajo el uso de *Bacillus subtilis* (Remitirse al capítulo 4, páginas 70 y 72) (Vitetta et al., 2019; Prado-Rebolledo et al., 2017; Wingender et al., 2012).

Los ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, propionato y butirato) producto de la fermentación de carbohidratos estructurales a nivel intestinal tienen un papel importante en el desarrollo del intestino, el metabolismo y el crecimiento de los animales (Fang et al., 2020). El butirato ha sido reconocido como un metabolito clave en la regulación de la diferenciación y proliferación celular en la mucosa intestinal y, como una de las fuentes de energía preferidas por los colonocitos y enterocitos (Bedford & Gong, 2018; Sikandar et al., 2017), lo cual deriva en un mejor desarrollo del epitelio intestinal (Jacquier et al., 2019).

## **5.5. Conclusión.**

La inclusión de AEO y *Bacillus subtilis* mejoró de manera significativa el rendimiento productivo y la eficiencia en la utilización de los nutrientes presentes en la dieta en pollos de engorde con respecto a la adición de APC. Se evidenció una alta correlación positiva entre el desarrollo del epitelio intestinal y la tasa de crecimiento (GDP). Además, el crecimiento de géneros como *Prevotella*, *Bacteroides* y *Sphingomonas* pueden estar relacionados con una mejor integridad

intestinal y rendimiento productivo. No obstante, es necesario el desarrollo de estudios que involucren la aplicación de ciencias como: la metagenómica, la proteómica y la metabolómica para clarificar la relación entre el microbioma intestinal, el desarrollo del intestino y el desempeño productivo en pollos de engorde.

## Bibliografía.

- Al-Fataftah, A. R., & Abdelqader, A. (2014). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.10.012>
- Aviagen. (2017). *Ross 308 AP. Objetivo de rendimiento.*
- Bedford, A., & Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition*, 4(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.010>
- Betancourt, L., Hume, M., Rodríguez, F., Nisbet, D., Sohail, M. U., & Afanador-Tellez, G. (2019). Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. *Poultry Science*, 98(10), 4777–4786. <https://doi.org/10.3382/ps/pez193>
- Blajman, J. E., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Berisvil, A. P., Scharpen, A. R., Fusari, M. L., Soto, L. P., Signorini, M. L., Rosmini, M. R., & Frizzo, L. S. (2015). Probióticos en pollos parrilleros: Una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002>
- Boroogeni, F. G., Vahjen, W., Männer, K., Blanch, A., Sandvang, D., & Zentek, J. (2018). *Bacillus subtilis* in broiler diets with different levels of energy and protein. *Poultry Science*, 97(11), 3967–3976. <https://doi.org/10.3382/ps/pey265>
- Cheng, C., Xia, M., Zhang, X., Wang, C., Jiang, S., & Peng, J. (2018). Supplementing oregano essential oil in a reduced-protein diet improves growth performance and nutrient digestibility by modulating intestinal bacteria, intestinal morphology, and antioxidative capacity of growing-finishing pigs. *Animals*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/ani8090159>
- Cheng, H., Jiang, S., & Hu, J. (2019). *Gut-Brain Axis: Probiotic, Bacillus subtilis , Prevents Aggression via the Modification of the Central Serotonergic System.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.86775>
- Du, R., Jiao, S., Dai, Y., An, J., Lv, J., Yan, X., Wang, J., & Han, B. (2018). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the gut microbiota of growth-retarded beef calves. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02006>
- Elshagabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Fang, S., Chen, X., Ye, X., Zhou, L., Xue, S., & Gan, Q. (2020). Effects of Gut Microbiome and Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Finishing Weight of Meat Rabbits. *Frontiers in*

- Microbiology*, 11(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01835>
- Felipe Patiño, F., Víctor Herrera, F., Daniela López, D., & Jaime Parra, S. (2019). Blood metabolites and zootechnical parameters in piglets weaned at two ages and with the addition of antimicrobials in the feed. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(2), 612–623. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.14887>
- Gadde, U. D., Oh, S., Lee, Y., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2017). Dietary *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials alleviate LPS-induced intestinal immunological stress and improve intestinal barrier gene expression in commercial broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 114, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.004>
- García-Sánchez, L., Melero, B., Diez, A. M., Jaime, I., Canepa, A., & Rovira, J. (2020). Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 176, 104935. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104935>
- Hrnčár, C., Gašparovič, M., Weis, J., Arpášová, H., Pistová, V., Fik, M., & Bujko, J. (2016). Effect of Three-strains Probiotic on Productive Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 49 (2), 149–154.
- Iclas, C. (2012). *INTERNATIONAL GUIDIN PRINCIPLES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INVOLVING ANIMALS DECEMBER 2012 COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATION OF MEDICAL SCIENCES and THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY AN NIMAL SCIENCE*.
- Iqbal, Y., Cottrell, J., Suleria, H., & Dunshea, F. (2020). Gut Microbiota-Polyphenol Interactions in Chicken: A Review. *Animals*, 10, 1391. <https://doi.org/10.3390/ani10081391>
- Jacquier, V., Nelson, A., Jlali, M., Rhayat, L., Brinch, K. S., & Devillard, E. (2019). *Bacillus subtilis* 29784 induces a shift in broiler gut microbiome toward butyrate-producing bacteria and improves intestinal histomorphology and animal performance. *Poultry Science*, 98(6), 2548–2554. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps/pey602>
- Jayaraman, S., Das, P. P., Saini, P. C., Roy, B., & Chatterjee, P. N. (2017). Use of *Bacillus Subtilis* PB6 as a potential antibiotic growth promoter replacement in improving performance of broiler birds. *Poultry Science*, 96(8), 2614–2622. <https://doi.org/10.3382/ps/pex079>
- Kogut, M. H., Yin, X., Yuan, J., & Broom, L. (2017). Gut health in poultry. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 12(August). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201712031>
- Kuritz, L. N., Westphal, P., & Santin, E. (2014). Probióticos na avicultura. *Ciência Rural*, 44(8), 1457–1465. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120220>
- Leary, S., Underwood, W., Lilly, E., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Clinic, A. V., Walla, W., Grandin, T., Collins, F., Greenacre, C., Gwaltney-brant, S., Mccrackin, M. A.,

- Polytechnic, V., Meyer, R., State, M., Miller, D., Shearer, J., Yanong, R., ... Division, A. W. (2013). AVMA Guidelines for euthanasia of animals 2013. In *AVMA Guidelines for euthanasia*. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50009-1>
- Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., Simon, R., Pélerin, F., Jüsten, P., & Urdaci, M. C. (2017). Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *83*, 54–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.010>
- Li, C. L., Wang, J., Zhang, H. J., Wu, S. G., Hui, Q. R., Yang, C. B., Fang, R. J., & Qi, G. H. (2019). Intestinal morphologic and microbiota responses to dietary *Bacillus* spp. in a broiler chicken model. *Frontiers in Physiology*, *10*(JAN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01968>
- Li, H., Cheng, J., Yuan, Y., Luo, R., & Zhu, Z. (2020). Age-related intestinal monosaccharides transporters expression and villus surface area increase in broiler and layer chickens. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Vol. 104, Issue 1, pp. 144–155). <https://doi.org/10.1111/jpn.13211>
- Li, Y., Xu, Q., Huang, Z., Lv, L., Liu, X., Yin, C., Yan, H., & Yuan, J. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(1), 195–204. <https://doi.org/10.1111/jam.12972>
- Linde, G. A., Colauto, ;, Albertó, ;, & Gazim, ; (2016). Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*. *Rev. Bras. Pl. Med*, *1*, 191–200. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_037](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037)
- Liu, Y., Yang, X., Xin, H., Chen, S., Yang, C., Duan, Y., & Yang, X. (2017). Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. *Animal Science Journal*, *88*(9), 1414–1424. <https://doi.org/10.1111/asj.12782>
- Madrid-Garcés, T. A., López-Herrera, A., & Parra-Suescún, J. E. (2018). Archivos de zootecnia. *Archivos de Zootecnia*, *67* (260)(0), 470–476.
- Madrid Garces, T. A., Parra Suescun, J. E., & Lopez Herrera, A. (2017). La inclusión de aceite esencial de orégano (*Lippia organoides*) mejora parámetros inmunológicos en pollos de engorde. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *15*(2), 75. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)75-83](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)75-83)
- Medina, N. M., González, C. A., Daza, S. L., Restrepo, O., & Barahona Rosales, R. (2014). Desempeño productivo de pollos de engorde suplementados con biomasa de *saccharomyces cerevisiae* derivada de la fermentación de residuos de banano. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *61*(3), 270–283. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v61n3.46873>
- Milford, A. B., Le Mouël, C., Bodirsky, B. L., & Rolinski, S. (2019). Drivers of meat

- consumption. *Appetite*, *141*, 104313. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.06.005>
- Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, *73*(2), 245–256. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>
- Muhammad, J., Khan, S., Su, J. Q., Hesham, A. E. L., Ditta, A., Nawab, J., & Ali, A. (2019). Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. In *Journal of Soils and Sediments*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02360-0>
- Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, *4*(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>
- Park, I., Lee, Y., Goo, D., Zimmerman, N. P., Smith, A. H., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2020). The effects of dietary *Bacillus subtilis* supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, and epithelial barrier integrity in broiler chickens infected with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, *99*(2), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.002>
- Peng, Q. Y., Li, J. D., Li, Z., Duan, Z. Y., & Wu, Y. P. (2016). Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, *214*, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>
- Prado-Rebolledo, O. F., Delgado-Machuca, J. de J., Macedo-Barragan, R. J., Garcia-Márquez, L. J., Morales-Barrera, J. E., Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., & Tellez, G. (2017). Evaluation of a selected lactic acid bacteria-based probiotic on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and intestinal permeability in broiler chickens. *Avian Pathology*, *46*(1), 90–94. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1222808>
- Rama, E., & Singh, M. (2019). *Regulations in Poultry Meat Processing* (pp. 293–301). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-05011-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-05011-5_13)
- Rhayat, L., Maresca, M., Nicoletti, C., Perrier, J., Brinch, K. S., Christian, S., Devillard, E., & Eckhardt, E. (2019). Effect of *Bacillus subtilis* Strains on Intestinal Barrier Function and Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00564>
- Salim, H. M., Huque, K. S., Kamaruddin, K. M., & Beg, M. A. H. (2018). Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. *Science Progress*, *101*(1), 52–75. <https://doi.org/10.3184/003685018X15173975498947>
- SAS/STAT® Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute. (2017). *SAS® SAS/STAT User's Guide, Version 14.3th Ed.* Cary, NC: SAS Institute Inc. 2017.
- Sikandar, A., Zaneb, H., Younus, M., Masood, S., Aslam, A., Khattak, F., Ashraf, S., Yousaf, M.

- S., & Rehman, H. (2017). Effect of sodium butyrate on performance, immune status, microarchitecture of small intestinal mucosa and lymphoid organs in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(5), 690–699. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0824>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, D. C., Córdoba, Y., & Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(0), 89. <https://doi.org/10.18257/raccefy.156>
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>
- Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., Widiastuti, E., & Kusumanti, E. (2017). Dietary supplementation of probiotics in poultry exposed to heat stress - A review. *Annals of Animal Science*, 17(3), 591–604. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0062>
- Tan, S. M., de Kock, H. L., Dykes, G. A., Coorey, R., & Buys, E. M. (2018). Enhancement of poultry meat: Trends, nutritional profile, legislation and challenges. *South African Journal of Animal Sciences*, 48(2), 199–212. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i2.1>
- van der Aar, P. J., Molist, F., & van der Klis, J. D. (2017). The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 233, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.019>
- Vitetta, L., Llewellyn, H., & Oldfield, D. (2019). Gut Dysbiosis and the Intestinal Microbiome: *Streptococcus thermophilus* a Key Probiotic for Reducing Uremia. *Microorganisms*, 7(8), 228. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080228>
- Wahyono, N. D., & Utami, M. M. D. (2018). A Review of the Poultry Meat Production Industry for Food Safety in Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 953(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/953/1/012125>
- Wang, L., Zhu, F., Yang, H., Li, J., Li, Y., Ding, X., Xiong, X., & Yin, Y. (2019). Effects of dietary supplementation with epidermal growth factor on nutrient digestibility, intestinal development and expression of nutrient transporters in early-weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(2), 618–625. <https://doi.org/10.1111/jpn.13059>
- Wang, M., Yang, C., Wang, Q., Li, J., Huang, P., Li, Y., Ding, X., Yang, H., & Yin, Y. (2020). The relationship between villous height and growth performance, small intestinal mucosal enzymes activities and nutrient transporters expression in weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(2), 606–615. <https://doi.org/10.1111/jpn.13299>
- Wingender, G., Stepniak, D., Krebs, P., Lin, L., McBride, S., Wei, B., Braun, J., & Mazmanian,

S. (2012). Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice. *Gastroenterology*, *143*, 418–428.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.017>

Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., & Klunter, A. M. (2018). Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*, *4*(2), 179–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>



## **Capítulo 6: Consideraciones finales y conclusiones**

### **6.1. Sobre el antibiótico promotor de crecimiento (APC):**

En general, el antibiótico tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento productivo y la morfometría del intestino cuando es comparado con el tratamiento control, lo cual sustenta su uso en los últimos años con el objetivo de incrementar el rendimiento productivo en aves de corral. Sin embargo, fue evidente la poca favorabilidad del antibiótico sobre el microbioma, ya que disminuyó la riqueza y uniformidad de los ecosistemas microbianos del íleon, además de disminuir el crecimiento de géneros bacterianos de carácter beneficioso a nivel intestinal.

### **6.2. Sobre *Bacillus subtilis*:**

La adición de *Bacillus subtilis* mostró un efecto favorable sobre el desempeño zootécnico de las aves al incrementar significativamente la eficiencia en el uso del alimento con respecto al uso de APC; además, mejoró considerablemente el desarrollo de la morfología del intestino. *Bacillus subtilis* mostró un efecto positivo sobre la riqueza y uniformidad del microbioma en comparación a los demás aditivos, además de incrementar significativamente las poblaciones de bacterias benéficas a nivel intestinal.

### **6.3. Sobre el aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*):**

De manera similar al probiótico, el uso de AEO evidenció incrementos significativos en el rendimiento productivo de las aves y desarrollo del epitelio intestinal. Si bien se encontró una clara disminución de la riqueza microbiana bajo la adición de AEO, es destacable el crecimiento en proporciones significativas de géneros como *Bacteroides* y *Propionibacterium* que ejercen beneficios sobre el desarrollo del intestino y el rendimiento productivo.

#### **6.4. Conclusión general.**

En general, *Bacillus subtilis* y el aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) mejoran el rendimiento productivo y la morfología intestinal; además, mostraron garantizar el equilibrio de las comunidades bacterianas presentes en el íleon de pollos de engorde en estudio, lo que convierte a estos aditivos en alternativas seguras y prometedoras frente al uso de antibióticos en la alimentación de aves de corral. Sin embargo, cabe resaltar que las condiciones ambientales, de bioseguridad y productivas de las granjas, así como la composición, dosis y tipo de aditivo utilizado son factores importantes a tener en cuenta al momento de hacer la transición a una alimentación libre de antibióticos.

#### **6.5. Recomendación.**

Un mejor entendimiento en el efecto de estos aditivos sobre la modulación del microbioma y la relación de este sobre la salud del intestino y el desempeño zootécnico de aves de corral será alcanzado mediante el uso de ciencias como la proteómica y la metabolómica, puesto que aportaran información mas clara acerca de las interacciones entre los microorganismos, sus metabolitos y el hospedador.