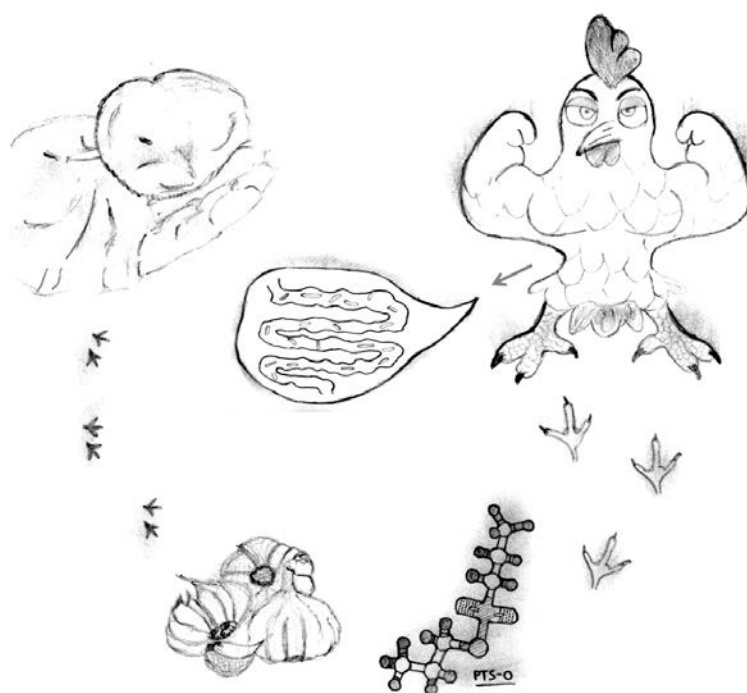


EFFECTOS DE NUEVOS ADITIVOS ALIMENTARIOS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DIGESTIVA EN POLLOS BROILER



Tesis Doctoral

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN HUMANA.



M^a JESÚS PEINADO MARTÍNEZ

GRANADA, 2015

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ)

Instituto de Nutrición Animal (INAN)

Y

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

**EFFECTOS DE NUEVOS ADITIVOS ALIMENTARIOS SOBRE
LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DIGESTIVA EN
POLLOS BROILER**

M^a JESÚS PEINADO MARTÍNEZ

Granada, 2015

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ)

Instituto de Nutrición Animal (INAN)

Y

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

**EFFECTOS DE NUEVOS ADITIVOS ALIMENTARIOS SOBRE
LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DIGESTIVA EN
POLLOS BROILER**

Tesis Doctoral presentada por:

M^a JESÚS PEINADO MARTÍNEZ

Realizada bajo la dirección del doctor:

Luis Ángel Rubio San Millán.

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN HUMANA.



Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología



Estación Experimental del Zaidín
Depto. de Fisiología y
Bioquímica de la Nutrición Animal



Consejo Superior de
Investigaciones Científicas

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales
Autora: María Jesús Peinado Martínez
ISBN: 978-84-9125-488-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42252>

La doctoranda, M^a Jesús Peinado Martínez, y el director de tesis, Luis Ángel Rubio San Millán garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 01 Octubre de 2015.

Luis Ángel Rubio San Millán

Director/es de la Tesis



Fdo.:

M^a Jesús Peinado Martínez

Doctoranda



Fdo.:

La realización de la presente tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la concesión de una beca JAEpredoc, propia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El trabajo expuesto forma parte de dos proyectos concedidos por el Ministerio de Economía y Competitividad AGL2012-32894 **“Evaluación de aditivos antimicrobianos y estudio de la correlación entre la composición de la microbiota digestiva y parámetros fisiológicos y productivos en broilers”** y AGL2009-11925 **“Evaluación de aditivos con potencial actividad moduladora de la microbiota digestiva en pollos broiler en crecimiento”**

La dirección de esta Memoria de Tesis Doctoral la ha llevado a cabo el doctor Luis A. Rubio San Millán, del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ, CSIC).

Los resultados de los ensayos que recoge esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, I. Aranda-Olmedo, L. A. Rubio. Garlic derivative PTS-O affects pathogenic and non-pathogenic intestinal microbiota composition and improves performance in growing broiler chickens. IVWorkshop: Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica. Madrid, 2013.

M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, L. A. Rubio. Effects of garlic derivative PTS-O against broiler enteropathogens in vivo. Workshop: Feed Your Knowledge: Healthy feed for healthy food. Barcelona, 2012.

M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, L. A. Rubio. Efectos productivos, fisiológicos y microbiológicos de la inclusión de nuevos prebióticos en raciones para pollos broiler. II Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba, 2012.

Y, así mismo, forman parte de las siguientes publicaciones:

Rubio, L.A., Peinado, M.J., Ruiz, R., Suárez-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J.M. Correlations between changes in intestinal microbiota composition and performance parameters in broiler chickens. J ANIM PHYSIOL AN N, 2015, 99 (3), 418-423.

Peinado, M.J., Ruiz, R., Echávarri, A., Aranda, I., Rubio, L. A. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves performance in broilers. ANIM FEED SCI TECH, 2013, 181, 87- 92.

Peinado, M.J., Ruiz, R., Echávarri, A., Rubio, L. A. Garlic derivative PTS-O is effective against broiler pathogens in vivo, 2012, POULTRY SCI, 91, 2148-2157.

A mi familia

A Jose

A Raquel

AGRADECIMIENTOS

Llegados a esta etapa, no puedo más que agradecer a cada uno de vosotros por vuestro apoyo y cariño durante todo este tiempo y en especial este último año, tan complicado para mi familia.

En primer lugar quiero agradecerle a mi director de tesis, Luis Rubio, su comprensión durante el tiempo que hemos compartido juntos, no hay palabras de agradecimiento suficientes para expresar lo que significa para mí la persona que me abrió las puertas del mundo laboral y que con tanta paciencia ha sabido aguantar mis tropiezos profesionales y problemas personales que se han sucedido hasta la fecha, siempre recordaré tu bondad y semblante amable.

Gracias a Rafael Giménez Martínez, una persona a la que admiro y tengo un gran cariño tanto por su forma de ser como por su profesionalidad, gracias a ti he conseguido llegar hasta aquí y no sabes cuánto te lo agradezco.

Gracias también a todo el personal del departamento, a Juan, Rafa, Paco, Rosa, Pepe, Luis Lara, David, Ignacio, Alfonso, Edu, Ignacio Fernández Figares, Ana Esteban e Isabel Seiquer por vuestra colaboración en mi trabajo y vuestra simpatía hacia mi persona.

Especialmente quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos por ayudarme a atravesar las diferentes etapas de mi tesis que han sido en algunos casos muy difíciles:

A Ana Haro, Cristina Delgado, Mamen y Raquel Olías por ser siempre tan encantadoras y cuidarme, en especial en esta última etapa que tanto he necesitado. A Julia, Isa, Leti, Thays, Patri, Migue, Alfonso y todos los que ya no están, pero, que me han acompañado a lo largo del camino, gracias por todo. A Mari e Isabel Aranda, gracias por vuestros consejos, vuestro cariño y vuestra comprensión. A Lucre, mil gracias por ayudarme con la tesis y por tu preciosa amistad. A Eva Ramos, por ser tan buena amiga, eres muy importante para mí. A Gonzalo, un chico genial al que tengo mucho cariño, A Ana Arco y M^a Luz gracias por todo lo que haceis por mí, por vuestros maravillosos abrazos, por ser un consuelo y por alegrar mi vida.

A Eli, Mari y Ana Echávarri por vuestros consejos, por secar mis lágrimas, por vuestras risas y apoyo incondicional todos estos años.

A Soraya, has compartido conmigo muchos momentos buenos y malos en esta última etapa y te considero una gran amiga, gracias por escucharme.

Gracias también a mi amiga Elena por nuestros casi 15 años de amistad, por ser parte de mi familia y por ayudarme en tantísimos momentos difíciles, por nuestras fiestas y nuestras risas, eres la mejor.

Quiero dar las gracias también a mi segunda familia por vuestro cariño, a Antonio, Josefa, Sergio, Elena y Kike.

A Raquel, mi maestra en el mundo de la investigación, la que me ha enseñado todo lo que sé, un ángel que ha caído del cielo y ha venido a posarse a mi lado con la que he tenido la suerte de compartir estos años, has estado en todo lo importante que ha ocurrido en mi vida y espero que así siga siendo para siempre, eres mi hermana y siempre te llevo conmigo.

A Laura, la que espero que sea muy pronto mi cuñada oficialmente, por ser como eres, por tu gran bondad, por tu dedicación y por tu cariño hacia mí, por ser un ejemplo de superación y de constancia, vas a lograr todo lo que te propongas y yo estaré ahí para verlo.

Gracias a mi maravillosa familia, la mejor del mundo y por la que doy gracias a Dios cada día que pasa, sois lo mejor que tengo y os quiero hasta el infinito y más allá, a mis abuelos por estar siempre conmigo, a mis padrinos Mario y Pachú y a sus respectivas parejas Jose M^a y M^a del Mar por quererme como una hija, a mis tíos y tías por todo vuestro cariño y apoyo desde pequeña, en especial a mi tío Alfonso y a mi tío Gonzalo ejemplos de superación, bondad y buen carácter y a este último y a su mujer Mati por hacerme el mejor regalo, convertirme en madrina de su preciosa hija, a todos mis primos y en especial a mi primo Javier y mis primas Cristina, Beatriz y María, gracias por ser más que amigas, más que primas, sois mis hermanas, una para todas y todas para una.

A Jose, la persona con la que comparto mi vida y que me hizo ver la luz después de tanta oscuridad, que me ha enseñado lo que es amar de verdad y lo que es la verdadera felicidad, gracias por estar siempre a mi lado y por darme esos empujoncitos que a veces tanto necesito, lo eres todo para mí y no hay tiempo en esta vida para alcanzar todos los sueños que quiero hacer realidad contigo.

Por último quiero agradecer a mis padres y a mi hermano, todos estos años de comprensión y apoyo, de cariño y de mil cosas más, sois la suerte de mi vida y no os cambiaría por nada del mundo. Papá, estos últimos años han sido muy duros para todos, pero, en especial para ti, sigue luchando que Dios te recompensará, seré tu apoyo siempre y nunca dejaré que te caigas, tu puedes con esto. Mamá, siempre he aspirado a ser una mujer como tú y espero conseguirlo algún día, eres un ejemplo de dulzura, saber estar, responsabilidad y las mejores cualidades imaginables y espero ser una madre al menos la mitad de buena que tú, tienes un gran mérito al enfrentarte a tantas cosas en la vida y tengo mucho que agradecerte. A mi hermano Pablo, la persona que más admiro en el mundo, me encantaría ser como tú y tener tu fuerza, tu bondad y tu paciencia a la hora de enfrentarte a todo, eres el mejor hermano que existe y no hay palabras suficientes para decirte lo que significas para mí, aunque creo que lo sabes, lo daría todo por ti.

*Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es hora de comprender más,
para temer menos.*

Marie Curie (1867-1934)

*Cada obra de amor, llevada a cabo con todo el corazón, siempre logrará acercar a la gente a
Dios.*

Madre Teresa de Calcuta (1910-1997)

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la
voluntad.*

Albert Einstein (1879-1995)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de tablas	16
Índice de figuras	18
Listado de abreviaturas	20
Capítulo 1: Introducción y objetivos	23
1.1. Introducción General	24
1.2. Objetivos	26
Capítulo 2: Revisión bibliográfica	27
2.1. Producción aviar mundial, europea y española	28
2.1.1. Breve historia y evolución de la producción avícola mundial	28
2.1.2. Eficiencia de la producción avícola	29
2.1.3. La Producción Cárnica Mundial	29
2.1.4. Producción mundial y europea de carne de pollo	30
2.1.5. Caracterización del sector de la carne de ave en España	32
2.1.5.1. Producción y censo	32
2.1.5.2. Explotaciones	33
2.1.5.3. Comercio exterior	34
2.1.5.4. Precios y consumo	34
2.2. Dietas empleadas en la industria aviar en las diferentes fases de Crecimiento del pollo de engorde. Evolución de las mismas	34
2.2.1. Características y evolución de las dietas avícolas a nivel mundial	34
2.2.2. Requerimientos nutricionales de los pollos de engorde	35
2.2.2.1. Requerimientos nutricionales principales de los pollos de engorde	38
2.2.3. Fases de crecimiento de los pollitos y sus diferentes dietas a nivel mundial.	39
2.2.4. Principales ingredientes que se incluyen en las dietas de los pollos de engorde a nivel mundial	39
2.2.5. Avances en nutrición aviar a nivel mundial	40
2.3. Evaluación de la digestibilidad y parámetros relacionados en pollos de engorde	41

2.3.1. Concepto de digestibilidad. Relevancia y utilidad de este parámetro	41
2.3.2. Métodos para determinar la digestibilidad	42
2.3.3. Digestibilidad aparente y verdadera	44
2.3.4. Energía	45
2.3.5. Fibra y compuestos no digestibles	46
2.4. Estudio del pollo tipo broiler desde el punto de vista nutricional	47
2.4.1. Características del pollo broiler	47
2.4.2. Sistema gastrointestinal	47
2.4.2.1. Proceso de la digestión	49
2.4.2.2. Factores relevantes que afectan al desarrollo del GIT en las aves	49
2.4.2.3. Mucosa del GIT	50
2.5. Microbiota digestiva aviar. Flora habitual y flora patógena	51
2.5.1. Microbiota del GIT en broilers	51
2.5.2. Flora habitual presente en el intestino de pollos broiler	53
2.5.3. Flora patógena presente en el intestino de pollos broiler.		
Implicaciones sanitarias	54
2.5.4. Principios de higiene de la carne que se aplican a la producción primaria	...	58
2.6. Técnicas para evaluar y/o cuantificar la microbiota gastrointestinal	...	59
2.6.1. Cultivos microbianos	59
2.6.2. Microscopía de fluorescencia	59
2.6.3. Métodos moleculares	59
2.6.3.1. Hibridación fluorescente in situ (FISH)	61
2.6.3.2. Hibridación dot-blot con sondas dianas para RNA ribosómico	61
2.6.3.3. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)	62
2.6.3.4. Electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE)	62
2.6.3.5. Secuenciación de DNA ribosómico	62
2.6.3.6. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP)	62
2.6.4. PCR a tiempo real (RT-PCR)	63
2.7. Antibióticos promotores del crecimiento (AGP)	68

2.8. Búsqueda de sustancias alternativas empleadas como aditivos. El Ajo y sus derivados: antecedentes históricos, composición química y efectos antimicrobianos	73
2.8.1. Alternativas a los AGP	73
2.8.1.1. Alternativas a los AGP que modifican la composición de la microbiota digestiva en aves	77
2.8.1.2. Alternativas a los AGP que tienen efecto sobre la digestibilidad de nutrientes y la estructura histológica del intestino	78
2.8.2. Antecedentes históricos del ajo y sus derivados como aditivos alimentarios....	79
2.8.3. Química y propiedades funcionales del ajo y su componente principal, la Alicina	80
2.8.4. El ajo y sus derivados como agentes antimicrobianos	82
2.8.5. Estudios in vitro con ajo y sus derivados	83
2.8.6. Estudios in vivo con ajo y sus derivados	85
Capítulo 3: Metodología y resultados	87
3.1. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens in vivo	89
3.2. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens	110
3.3. Correlations between changes in intestinal microbiota composition and performance parameters in broiler chickens	124
Capítulo 4: Discusión general	135
4.1. PTS-O modificó la composición de la microbiota digestiva en broilers....	137
4.2. PTS-O mejoró el rendimiento productivo y la digestibilidad de nutrientes y modificó la estructura histológica intestinal en broilers	140
4.3. Posibles relaciones entre los valores de los índices productivos y la composición de la microbiota digestiva en broilers	143
4.4. Algunas implicaciones en nutrición aviar y perspectivas futuras	151

Capítulo 5: Conclusiones	153
Capítulo 6: Resumen	155
Capítulo 7: Referencias Bibliográficas	158

Índice de tablas

Capítulo 2.

Tabla 2.1. Panorama del mercado mundial de la carne	30
Tabla 2.2. Requerimientos nutricionales para pollos de engorde	37
Tabla 2.3. Recomendaciones prácticas de vitaminas y microminerales para pollos de carne	39
Tabla 2.4. Posibles mecanismos de acción de las sustancias alternativas a los AGP	73

Capítulo 3.

Publication 1.

Table 1. Composition (g/Kg) of the diet used in both experiments	93
Table 2. Sequences of the primers used for the quantitative determination of microbial groups in the intestines of the broiler chickens in both experiments	96
Table 3. Effect of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) dietary addition on the log ₁₀ number of copies per milligram of intestinal content of <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter jejuni</i> , and <i>Clostridium perfringens</i> in the ilea of birds in experiment 1 ^{1,2}	99
Table 4. Effect of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) dietary addition on the log ₁₀ number of copies per milligram of intestinal contents of enterobacteria and <i>Escherichia coli</i> in the crop, ileal, and cecal contents of birds in experiment 1 ^{1,2}	99
Table 5. Effect of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) on the ileal log ₁₀ number of copies per milligram of intestinal content of <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter jejuni</i> , and <i>Clostridium perfringens</i> in the ilea of birds in experiment 2 ^{1,2}	100
Table 6. Morphology ¹ of the ileal sections of 21-d-old broiler chickens	

fed on control or experimental (propyl propane thiosulfonate; PTS-O-90) diets in experiment 1.	100
Publication 2.		
Table 1. Sequences of the primers used and q-PCR conditions for SYBR Green 16 rDNA determination of microbial groups in the chicken intestinal samples	114
Table 2. AMEn (cal/g), ileal apparent N digestibility and fecal apparent digestibility of energy, N, fat, aNDFom-NDF, ADFom-ADF and total NSP of growing broiler chickens fed on PTS-O supplemented diets	116
Table 3. Mucosal protein content (mg/g of mucosa) and enzymatic specific activity in the ileal mucosa of broiler chickens fed on diets supplemented with PTS-O from 1 to 21 d of age	119
Publication 3.		
Table 1. Regression equations where ordinate values (<i>y</i>) represent the performance parameters measured, and abscissa (<i>x</i>) values are the proportion of each bacterial group respect to the total bacteria (both expressed in total log ₁₀ number of copies) in the contents of the intestinal sections	128

Índice de figuras.

Capítulo 2.

Figura 2.1. Dinámica de crecimiento de pollo de engorde	29
Figura 2.2. Principales países productores de carne de pollo en el año 2013 ...	31
Figura 2.3. Producción de carne de pollo en la Unión Europea en el año 2013..	32
Figura 2.4. Número de las principales explotaciones por especies avícolas en España	33
Figura 2.5. Método <i>in vivo</i> , mediante indicador indirecto, para determinar la digestibilidad	44
Figura 2.6. Tracto digestivo del pollo de engorde	48
Figura 2.7. Mecanismos por los cuales la microbiota puede contribuir a la salud gastrointestinal de los animales y el hombre	52
Figura 2.8. Composición de la microbiota de ileon y ciego de pollos broiler determinada por la secuenciación de 1230 clones del 16S ribosómico procedente de una colección de DNA. A, composición bacteriana del íleon. B, composición bacteriana del ciego	54
Figura 2.9. Número de casos de campilobacteriosis y salmonelosis humana en España en el intervalo de los años 2005-2011	58
Figura 2.10. Fases que tienen lugar en el ciclo de PCR	64
Figura 2.11. Ejemplo de las curvas de amplificación de patrones y muestras de contenido cecal de pollos en RT-PCR	65
Figura 2.12. Fases de amplificación durante el desarrollo de una RT-PCR	66
Figura 2.13. Ejemplo de recta patrón en RT-PCR correspondiente a <i>Lactobacillus</i> spp	67
Figura 2.14. Ejemplo de picos de Melting en RT- PCR	67
Figura 2.15. Estructura química de la alicina	81
Figura 2.16. Estructura química de la aliina	81

Figura 2.17. Estructura química del PTS	83
Figura 2.18. Estructura química del PTS-O	83
Capítulo 3.		
Publication 1.		
Figure 1. Effects of dietary inclusión of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) on final BW (A), feed intake (B), and feed: gain ratio (C) of chickens in experiment 1. ^{a,b} Bars with different letters were significantly different ($P < 0.01$). Values are means (8 replicates of 6 birds each) with their SD in bars	98
Figure 2. Light microscope photograph showing the histological structure of ileal sections of broiler chickens fed on the control (A and B) or propyl propane thiosulfonate (PTS-O-90; C and D) diets. Villi in PTS-O birds were taller and wider than those of controls. For specific measurements, see Table 6. Bars represent 200 (A and C) or 100 (B and D) μm	101
Publication 2.		
Figure 1. Log_{10} number of copies /mg dry intestinal content (A, crop; B, ileum; C, cecum) in broiler chickens fed on containing no additive (control) (solid bars) or PTS-O (striped sided lines, 45 ppm; striped horizontal lines, 90 ppm) containing diets. Values are means of 18 values with their SEM in bars. Bars with different letters for each bacterial group differ ($P < 0,05$)	117
Capítulo 4.		
Figura 4.1. Representación esquemática de las sustancias químicas mayoritarias presentes en los componentes del género <i>Allium</i> con actividad antimicrobiana	139

Listado de abreviaturas

En la mayoría de los casos se han utilizado los acrónimos en inglés debido a que es su uso más común y también porque aparecen de esta forma en las publicaciones utilizadas.

ADF: Fibra ácido detergente.

AME: Energía metabolizable aparente.

AMEn: Energía metabolizable aparente a balance nitrogenado cero.

AGP: Antibióticos promotores del crecimiento.

AMP: Antimicrobianos peptídicos.

BSH: Hidrolasa de las sales biliares.

Ca: Calcio.

CD: Profundidad de las criptas intestinales.

CDC: Centers for Disease

Ct: Cycle Threshold

DFM: Microorganismos alimentarios directos.

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EC: European Comission.

ECDC: European Centre for Desease Prevention

ED: Energía digestible

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EMV: Energía Metabolizable Verdadera.

EN: Energía neta.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FC: Caramelo de fructosa.

FDA: Food and Drug Administration.

FEDNA: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

FEEDAP: Panel de aditivos y productos o sustancias usadas en alimentación animal de la EFSA.

FERG: Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria.

FISH: Hibridación fluorescente in situ.

FOS: Fructooligosacáridos.

GC: Contenido en guanina y citosina.

GE: Energía bruta.

GIT: Tracto gastrointestinal.

HACCP: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos.

LAD: Lignina Ácido Detergente.

ME: Energía metabolizable.

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

MJ: Megajulio.

MOS: Mananoligosacáridos.

N: Nitrógeno.

NDF: Fibra Neutro Detergente.

NRC: National Research Council (Estados Unidos de América)

NSP: Polisacáridos no amiláceos.

OECD: Organización para la cooperación y desarrollo económicos.

OIE: World Organization for Animal Health.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P: Fósforo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PFA: Aditivos alimentarios fitogénicos.

PTS: Propil propano tiosulfonato.

PTS-O: Propil propano tiosulfonato.

rDNA: ADN ribosómico.

REGA: Registro General de Explotaciones Ganaderas.

RNA: Ácido ribonucleico

RSS: Especies reactivas sulfuradas.

RT- PCR: PCR a tiempo real.

TGGE: Electroforesis en gel de gradiente de temperatura.

TM: Millones de toneladas.

TRFLP: Polimorfismo de Longitud de fragmentos de restricción terminales.

T-RFs: Fragmentos de restricción terminales.

UI: Unidades Internacionales

USDA: United States Department of Agriculture.

VH: Altura de las vellosidades intestinales.

WOAH: World Organization of Animal Health.

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

1.1. Introducción General

Independientemente de su interés como especie zootécnica, el pollo doméstico (*Gallus gallus*) ha constituido también un modelo experimental importante para el estudio científico de cuestiones biológicas, microbiológicas e inmunológicas durante los últimos dos milenios (Stern, 2004). Los estudios basados en esta especie han contribuido a muchos descubrimientos relevantes. Como ejemplo se puede aducir la *Historia Animalum* de Aristóteles, que incluye una descripción de un embrión de pollo, con toda probabilidad la primera referencia al pollo como modelo para el estudio de la embriología (Burt, 2007). El pollo ha sido empleado como modelo experimental en el descubrimiento de la circulación sanguínea (Harvey, 1628); en el estudio de la transmisión de infecciones (Pasteur, 1880); en estudios genéticos: de hecho, los primeros mapas genéticos mostraron la relación entre sexos en pollos (Spillman, 1909); en el estudio del desarrollo embrionario de los vertebrados, ya que la manipulación de embriones es relativamente sencilla en esta especie y se puede acceder al embrión de manera rápida empleando huevos incubados (Stern, 2005). Gracias al pollo como modelo experimental se descubrieron las células B y se aislaron los primeros oncogenes (Brown y col., 2003). Más recientemente, con el proyecto genoma del pollo en pleno auge, se emplearon pollos con ciertas mutaciones como modelos para el estudio de la degeneración de la retina (Burt, 2007).

Desde el punto de vista agropecuario, el pollo doméstico es el animal doméstico más común, se encuentra entre los más importantes a nivel agrario y de producción alimentaria y es el tipo de ave más abundante y más ampliamente distribuida en todo el mundo, ya que crece en islas y continentes lejanos desde el Ártico hasta las Malvinas (Sergeant y col., 2014). La carne de pollo es la fuente más común de proteína de origen animal para los seres humanos a nivel mundial (Videnska y col., 2014). Este tipo de carne tiene menor contenido en hierro que las de vacuno o cordero (0,7 mg/100 g de carne). Sin embargo, su contenido en grasa es también inferior, conteniendo la pechuga tan sólo 2 mg de grasa por cada 100 g de carne, estando constituida la mitad de ésta por grasas monoinsaturadas y un tercio saturadas, con muy baja proporción de grasas *trans* en comparación con las de vacuno y cordero. Esta composición lipídica puede considerarse ventajosa en relación con las dietas relacionadas con problemas coronarios y patologías relacionadas con el cáncer (Bingham, 2006). Por otra parte, la carne de ave es rica en ácidos grasos omega 3 y en minerales y vitaminas como la niacina (FAO, 2013a).

Como para el resto de animales superiores y del hombre, la microbiota del sistema gastrointestinal (GIT) de las aves ejerce un papel relevante en la absorción y aprovechamiento de los nutrientes que estos animales ingieren en sus dietas habituales (Bjerrum y col., 2006). Los cambios en la composición de la microbiota bacteriana pueden influir de manera tanto favorable como adversa, afectando tanto a la digestión como a la absorción de nutrientes, y pudiendo por tanto dar lugar a problemas y desajustes en el rendimiento productivo y económico (Uni y col., 1999). En consecuencia, el control de la microbiota se hace imprescindible, influyendo tanto en los resultados productivos como en la calidad de la carne (Lallès y col., 2009). Se considera que la microbiota intestinal juega un papel crucial en el estado sanitario, bienestar y productividad de los animales (Callaway y col., 2008; Ley y col., 2008). Un pobre rendimiento y un aumento en la susceptibilidad a la hora de contraer enfermedades en pollos puede en muchos casos atribuirse a la flora potencialmente patógena

presente en el intestino que compite con el huésped por los nutrientes y puede causar infecciones subclínicas (Tekeli y col., 2011).

Los objetivos de la alimentación avícola pueden relacionarse en general con dos grupos de acciones claramente diferenciados: i) satisfacer los requerimientos de las aves para un adecuado rendimiento productivo, y ii) controlar los ingredientes alimenticios para obtener una producción sostenible, económica y saludable. Desde una perspectiva económica y ecológica, la necesidad de mejorar la utilización de la energía procedente de la dieta y la utilización de nutrientes se están volviendo cada vez más importantes. A este respecto, hay que prestar especial atención a la digestibilidad de nutrientes y a la exploración de la mejora de la retención de nutrientes que resulte en un aumento de la utilización energética y productividad de aves (Cowieson y Ravindran, 2008). Por otra parte, hay que considerar que el estado sanitario del animal, y la salud gastrointestinal en particular, constituye un factor determinante tanto desde el punto de vista productivo como sanitario. A su vez, la salud gastrointestinal depende de muchos factores que incluyen la integridad del intestino, el balance adecuado de la microbiota y el estado del sistema inmune. Por todo ello, la composición de las dietas de los pollitos es realmente relevante afectando al desarrollo de órganos, crecimiento de tejidos y maduración del sistema inmune (Kelly y Conway, 2001).

Los antibióticos promotores del crecimiento (AGP) han sido utilizados durante años para mantener un determinado estado microbiano de las aves y por ende un adecuado rendimiento productivo y sanitario (Looft y col., 2012). Sin embargo, debido a la posibilidad de aparición de resistencias a antibióticos usados con fines terapéuticos, y a sus riesgos potenciales tanto para la salud tanto humana como animal, la Comisión Europea prohibió en Junio de 2006, el uso de estos antibióticos en producción animal (EC Regulation No. 1831/2003; <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>). Como consecuencia de la entrada en vigor de esta ley en Europa, empezó a crecer la demanda de alternativas a los AGP, también en gran parte debido a la aparición de determinadas patologías ligadas a infecciones bacterianas cuyo foco inicial se localiza en animales tales como infecciones de etiología enterocócica, estafilocócica y las ocasionadas más frecuentemente como salmonelosis y campylobacteriosis (Casewell y col., 2003). Estas afecciones del GIT junto con otras (enteritis necrótica aviar), constituyen una gran preocupación dentro de la industria avícola porque producen grandes pérdidas productivas, aumentan la mortalidad en las aves y dan lugar a contaminaciones alimentarias de los productos avícolas de consumo humano.

Evidentemente, es necesario que las alternativas dirigidas en principio a la sustitución de los AGP no comprometan la salud del ganado ni tampoco la productividad de la industria actual (Diarra y Malouin, 2014). Un número considerable de estudios se han llevado a cabo en los últimos años para comprobar la utilidad de ciertos compuestos que pudieran sustituir de manera eficaz a los antibióticos, hierbas, especias, extractos vegetales y aceites esenciales (Bozkurt y col., 2009). Dentro de la búsqueda de soluciones que se han ensayado los extractos vegetales, y muy particularmente los derivados del ajo, tienen un papel relevante debido a su larga trayectoria como antimicrobianos empleados con fines medicinales desde la antigua Grecia (Harris y col., 2001).

Ciertos componentes del ajo y sus productos derivados han demostrado tener una gran actividad antimicrobiana respecto a bacterias intestinales tradicionalmente descritas como patógenas o potencialmente patógenas, que causan diarreas y otros desórdenes gastrointestinales en animales (Amagase y col., 2001; Tataru y col., 2008). Sin embargo, la literatura es contradictoria a la hora de valorar los efectos de este tipo de derivados en pollos broiler no sólo en lo que a microbiota y afectación del sistema gastrointestinal se refiere, sino también a la influencia que pueden tener en el rendimiento productivo y la modificación de parámetros fisiológicos y digestivos.

1.2. Objetivos

Dado el interés que reviste actualmente la búsqueda de alternativas capaces de reemplazar a los AGP, las grandes cualidades que poseen el ajo y sus derivados junto con la escasa información científica acerca de sus posibles mecanismos de acción y la necesidad de que la industria continúe avanzando en su rendimiento y productividad, se plantearon los siguientes objetivos para esta tesis doctoral:

1. Evaluar la posible utilidad de un derivado del ajo obtenido industrialmente (propil propano tiosulfonato, PTS-O), como sustituto de los AGP en broilers;
2. Determinar los efectos sobre parámetros microbiológicos y fisiológicos de la inclusión de PTS-O en las raciones para pollos broiler para establecer su mecanismo de acción;
3. Estudiar las posibles repercusiones a nivel productivo que conlleva la inclusión del aditivo PTS-O en las raciones de los pollos broiler.

Para alcanzar estos objetivos, se han llevado a cabo ensayos *in vivo* con pollos broiler en crecimiento. Se ha estudiado por tanto el efecto que la adición de PTS-O a diferentes concentraciones en la dieta diaria de los animales produjo sobre: i) bacterias de tipo patógeno y potencialmente patógeno (Publicación 1); ii) parámetros productivos, fisiológicos y de aprovechamiento de nutrientes (Publicación 2) y iii) se ha iniciado el estudio de la posible relación entre la composición de la microbiota digestiva y determinados parámetros productivos de las aves (Publicación 3).

Capítulo 2: Revisión Bibliográfica

2.1. Producción aviar mundial, europea y española

2.1.1. Breve historia y evolución de la producción avícola mundial

El pollo doméstico actual es el resultado de la domesticación de estos animales a lo largo de los últimos 8000 años (West y Zhou. 1988; Sawai y col., 2010; Tixier-Boichard y col., 2011), en regiones del sudeste asiático principalmente, y en menor grado del sudeste indio. Más tarde, los pollos se extendieron a Europa y África acompañando a la migración humana, aprovechando principalmente las rutas comerciales (Liu y col., 2006; Kanginakudru y col., 2008; Groeneveld y col., 2010; Storey y col., 2012; Mwacharo y col., 2013). La Edad de Hierro (3000 a.C.) fue el período principal para la dispersión de estas aves en Europa, mayoritariamente desde China, y de ahí al continente africano hacia el año 300 a.C. (Lyimo y col., 2014). En el siglo XVI, los pollos fueron llevados a América desde Europa y en el caso de los pavos ocurrió de forma inversa. La industria avícola moderna surge a finales del siglo XIX en Europa y América; los avances e investigaciones que se suceden hasta los años 30 provocan un rápido desarrollo de la industria a partir de esa época. El sistema de producción avícola tal y como hoy lo conocemos empieza a organizarse en los años 40 del pasado siglo. Sin embargo, en Norte América este proceso es un poco más largo completándose finalmente hacia 1970 (FAO, 2010). En España, la industria del broiler como tal no comenzó hasta finales de los años 50, con la entrada de las primeras estirpes de aves pesadas procedentes de USA (Castelló y col., 2002).

La mejora de la productividad en el sector avícola ha sido espectacular, tal y como se observa en los estudios realizados por Havenstein y col. (2003) de la Universidad de North Carolina. Los pollos de engorde han alcanzado una producción muy superior a la esperada tiempo atrás, pasando de un índice de transformación de 2.6 en la década de los 50 a 1.7 en el año 2001. Esta fuerte mejora puede atribuirse a la alimentación en un elevado porcentaje (10 a 15%) y también a que se han realizado una serie de selecciones genéticas intencionadas comprobadas mediante técnicas cuantitativas tradicionales (Hunton, 2006). Los pollos de las líneas modernas actuales crecen muy rápidamente debido a su potencial genético (Zuidhof y col., 2014).

Los cambios demográficos que se están produciendo en el mundo requerirán una expansión sustancial de la producción de alimentos en la próxima década. Los países en vías de desarrollo, principalmente pertenecientes a continentes como Asia y América Latina, concentrarán más del 75 % de la producción agrícola adicional durante los próximos diez años. Además, coincidirán dos situaciones positivas para este sector: por una parte, se prevé que los precios relacionados con los cereales disminuirán durante al menos los próximos dos años; y por otra, la avicultura seguramente superará a la carne de cerdo y se convertirá en el producto cárnico de mayor consumo en los próximos 10 años (OECD-FAO., 2014). Es importante señalar aquí que el crecimiento del precio del cereal produce un impacto mucho menor en los costes de la producción avícola que en el resto de producciones de carne (FAO, 2010).

2.1.2. Eficiencia de la producción avícola

Como se ha podido comprobar en los últimos años, la producción de pollos de engorde es la más rentable a nivel económico y con ella se consigue un ahorro del tiempo de producción, ya que el índice de transformación (unidades de alimento necesario para la producción de 1 unidad de carne) de estas aves es muy bajo con respecto al resto (vacuno, caprino, bovino y cerdo). Por ejemplo, en el caso del cerdo, éste índice se sitúa alrededor de 4, mientras que en el pollo este valor no llega a 2kg de pienso por unidad de carne (figura 2.1.). Finalmente, desde una perspectiva cultural, es una carne de gran aceptación en la mayoría de los pueblos del mundo (FAO, 2010). Desde el punto de vista de la eficiencia relativa de la producción avícola comparada con el resto de producciones de alimentos de origen animal, podemos decir que, tanto en proteínas, como en minerales y vitaminas ésta es máxima en el caso de la producción de huevos y de carne de ave. Sin embargo, es importante tener en cuenta en esta comparación que los rumiantes son capaces de aprovechar los forrajes (Jull, 1953).

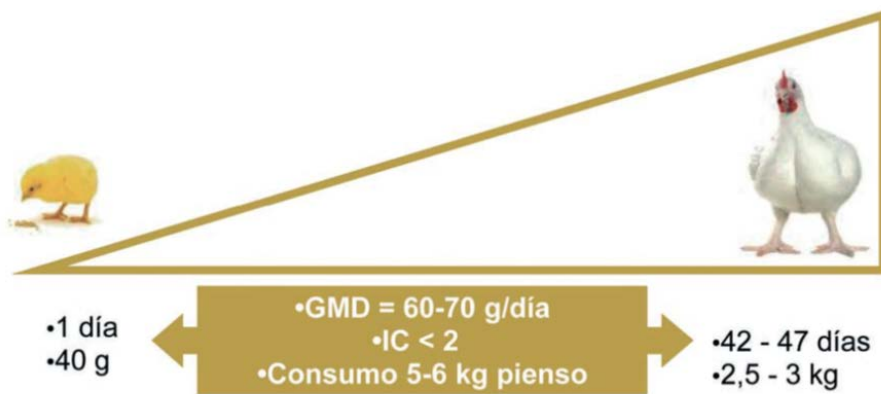


Figura 2.1. Dinámica de crecimiento de pollo de engorde (Santomá y col., 2006)

2.1.3. La Producción Cárnica Mundial

La producción mundial de carne va en continuo aumento. En 2013 aumentó moderadamente, hasta alcanzar los 308,2 millones de toneladas, y en 2014 llegó hasta las 311,8 millones de toneladas, es decir, un 1,1% más que el año anterior. Los países desarrollados son los protagonistas de este aumento. En 2013 el índice de precios de la carne en general disminuyó respecto a años anteriores, mientras que en el año 2014 aumentó considerablemente alcanzando los 186 puntos; en el año 2013 esta cifra fue de 179 puntos, creciendo por tanto en 7 puntos (FAO, 2013b; FAO, 2014). La disminución de precio de los piensos ha promovido el descenso de los precios de las carnes de ave y de cerdo, mientras los precios de la carne de bovino y de ovino se han mantenido constantes, como consecuencia de una limitada disponibilidad de las importaciones (FAO, 2014).

En la misma tendencia que la producción se encuentra el comercio mundial de carne, pero de manera más moderada e inferior a la media de los últimos años debido a las limitaciones de la producción en algunos de los principales países exportadores. El comercio de

la carne de ave aumentó considerablemente con respecto al de ovino y cerdo en el pasado año y se prevé que seguirá esa tendencia en años venideros. La carne de ave sigue siendo el principal producto comercializado, representando el 43% del total, seguida de las carnes de bovino, cerdo y ovino (FAO, 2014).

(Millones de toneladas)				
BALANZA MUNDIAL	2012	2013	2014	% Variación 2014 a 2013
Producción	304.2	308,5	311,8	1,1
Carne de bovino	67.0	67,7	68,0	0,5
Carne de ave	105.4	107,0	108,7	1,6
Carne de cerdo	112.4	114.3	115.5	1.1
Carne de ovino	13.7	13.9	14.0	0.5
Comercio	29.7	30.9	31.3	1.4
Carne de bovino	8.0	9.1	9.4	3.5
Carne de ave	13.0	13.2	13.5	2.4
Carne de cerdo	7.5	7.4	7.2	-2.1
Carne de ovino	0.8	1.0	1.0	-3.7
INDICADORES DE LA OFERTA Y LA DEMANDA				
Consumo humano per cápita				
Mundo (Kg/año)	42.9	42.9	42.9	-0.1
Desarrollados (Kg/año)	76.2	75.9	76.1	0.3
En desarrollo (Kg/año)	33.5	33.7	33.7	0.0

Tabla 2.1. Panorama del mercado mundial de la carne (FAO, 2014)

2.1.4. Producción mundial y europea de carne de pollo

El consumo de carne de pollo ha experimentado un gran incremento en las últimas décadas debido fundamentalmente al precio, un perfil nutricional adecuado, su bajo contenido en grasa, facilidad de preparación, versatilidad y buena aceptación por parte de la mayoría de las naciones. Este tipo de carne representa el 33% de la producción de carne global. En 2007, de los 269 millones de toneladas de carne producidas en el mundo, 88 millones de toneladas se correspondían con carne de ave (FAO, 2010). A nivel mundial (figura 2.2), los principales productores son EEUU y China, aunque el mercado mundial está dominado por Brasil, que desvía mayor cantidad de producto a la exportación, mientras que la UE ocupa el cuarto lugar de la producción mundial con un 11,4% del total (MAGRAMA, 2013).

Si hablamos de producción aviar a nivel mundial, los criterios que rigen los países que no pertenecen a la Unión Europea son algo menos restrictivos que los de la UE y se basan fundamentalmente en la competitividad del sector y en la sostenibilidad del mismo. Sin embargo, en Europa existen una serie de restricciones legales que provocan que el nivel de competitividad sea muy superior. Al contrario de lo que ocurre en el resto del mundo, en Europa la producción de pollos de carne debe de ser sostenible, eficiente y trazable (S.E.T.)

bajo criterios ambientales, de bienestar animal y de baja incidencia de zoonosis (FEEDAP, 2013), teniendo en cuenta la no incorporación de AGP.

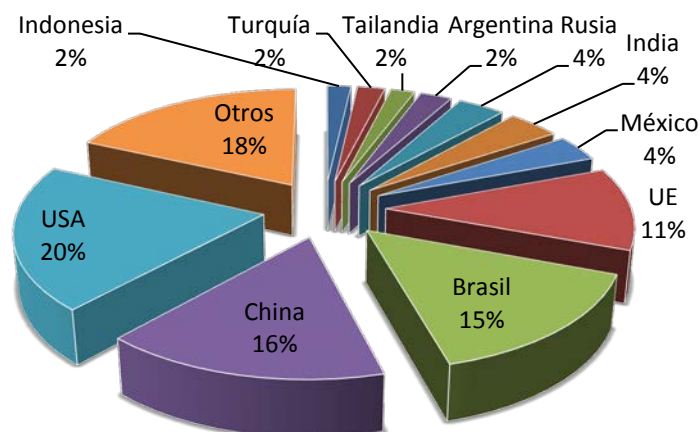


Figura 2.2. Principales países productores de carne de pollo en el año 2013 (USDA y Grupo de Expertos de los Comités consultivos para la UE, 2014)

A pesar de la prohibición del uso de AGP, la productividad en broilers ha aumentado gradualmente en Europa durante los últimos años. Las compañías dedicadas a la producción aviar trabajan en la mejora genética de las aves para poder mantener este aumento durante los próximos años. Los esfuerzos se centran sobre todo en mejorar la eficiencia alimentaria y las condiciones higiénico-sanitarias de las explotaciones para facilitar el correcto desarrollo y función del GIT, mejorando así finalmente la producción. Actualmente, la Unión Europea es uno de los principales productores del mundo en carne de pollo y exportador en valor neto de productos avícolas. A lo largo de los años se ha trabajado en el desarrollo del sector, la calidad de los productos y la protección de los consumidores. En 2012, se produjeron en los países de la Unión 12.4 millones de toneladas de carne de ave, se importaron 0,82 millones de toneladas y exportaron 1,3 millones de toneladas.

Los países que encabezan la lista de productores de carne avícola en Europa (figura 2.3) son Reino Unido, seguido de Alemania, España y Francia. Estos cuatro países producen la mitad de la carne de la Unión Europea (MAGRAMA, 2014). La Unión Europea importa productos avícolas de Brasil (70% de importaciones de la Unión) y pechugas y otros productos de alto valor económico de Tailandia (20%). La mitad de las exportaciones de la Unión se reparten entre los siguientes países: Arabia Saudita, Benín, Suráfrica, Hong Kong y Rusia. Más de 50 billones de pollos son criados anualmente como fuente de alimento ya sea carne o huevos. La producción del resto de especies avícolas tales como pavos, patos y gansos no es ni de lejos tan numerosa en la Unión (EC, 2013).

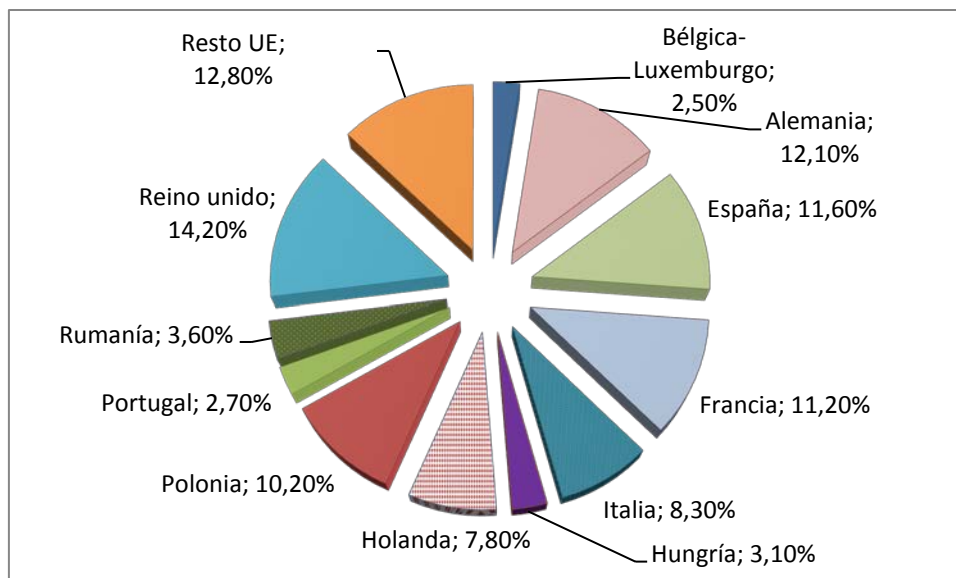


Figura 2.3. Producción de carne de pollo en la Unión Europea en el año 2013 (MAGRAMA, 2014)

2.1.5 Caracterización del sector de la carne de ave en España

Actualmente, la crianza avícola para producción de carne es uno de los sectores ganaderos más importantes de nuestra nación. La producción final de carne de ave representó el 10,8% de la producción final ganadera y el 3,7% de la producción final agraria en el año 2005. Con respecto a la década de los 90, la producción final de carne de ave ha experimentado un aumento del 38,3%. Aunque España se encuentra entre los primeros productores europeos de carne de ave, en el balance comercial nuestro país es en general principalmente importador. La producción de carne de ave ha experimentado un crecimiento continuado durante las últimas décadas, con el desarrollo de explotaciones avícolas con distintas orientaciones y especializaciones dentro del sector. El tipo de ave más producido es el pollo tipo broiler o pollo de engorde.

En las últimas dos décadas se ha producido un importantísimo desarrollo del sector avícola caracterizado por importantes aumentos tanto del censo como de la productividad de los animales. Las actuales explotaciones tienen censos por encima de los 20.000 animales, lo que permite que el coste de los gastos por ave disminuya hasta conseguir situar la producción en niveles rentables. En los últimos años se ha tendido a un aumento en el tamaño de las explotaciones disminuyendo al mismo tiempo el número de las mismas (Santomá y col., 2006).

2.1.5.1. Producción y censo

La producción de aves en nuestro país se estima en 2.557 millones de Euros, lo que supone el 5,8 % de la producción final agraria y un 15,3 % de la producción final ganadera. España produce aproximadamente 600 millones de pollos broiler por año y tiene un censo actual de gallinas ponedoras de unos 35 millones. En el caso de otras especies avícolas como pavos y patos la producción es bastante menor. El número de aves sacrificadas ha permanecido sin cambios durante los últimos 10 años, pero el peso final ha aumentado en este período a razón de 200 gramos por ave (Mateos y col., 2013). La producción de carne de

pollo en España se agrupa fundamentalmente en cuatro comunidades autónomas con Cataluña a la cabeza (28,7% del total, la Comunidad Valenciana (16,9%), Andalucía (15,8%) y Galicia (13,1%). La producción de pavo, en segundo lugar de importancia económica en España, se calcula alrededor de los 116.000 TM en contraste con la producción de carne de broilers que alcanzó 1.161.000 toneladas en el año 2012. En los próximos años, este número se mantendrá en torno al millón de toneladas y el pequeño déficit de abastecimiento será cubierto con importaciones procedentes de otros países de la Unión (MAGRAMA, 2013).

2.1.5.2. Explotaciones

Andalucía con 812 explotaciones es la segunda Comunidad Autónoma de España en cuanto al número de granjas dedicadas a la producción de pollos de engorde, con 812 explotaciones, siendo Cataluña la primera con cerca de 1000 explotaciones (REGA, 2013).

Las granjas reproductoras se dividen en dos tipos de explotaciones:

- a) Explotaciones de selección: se encargan de producir huevos para incubar destinados a la producción de aves de cría. En España están registradas 21 explotaciones de este tipo.
- b) Explotaciones de multiplicación: su objetivo es el de mantener aves de cría que producen huevos para incubar con destino a la producción de aves de explotación. Existen en España 338 explotaciones de este tipo.

En las explotaciones de producción de pollo, las granjas pueden pertenecer a la empresa, aunque suelen ser propiedad del trabajador. En nuestro país (figura 2.4) están registradas 8.467 granjas de engorde de pollos. La producción de pavo destaca con un total de 1.027 explotaciones. Otras producciones de cierta importancia son la perdiz, con 1.080 explotaciones, faisanes y palomas, aunque en estos casos suele tratarse de actividades artesanales (REGA, 2013).

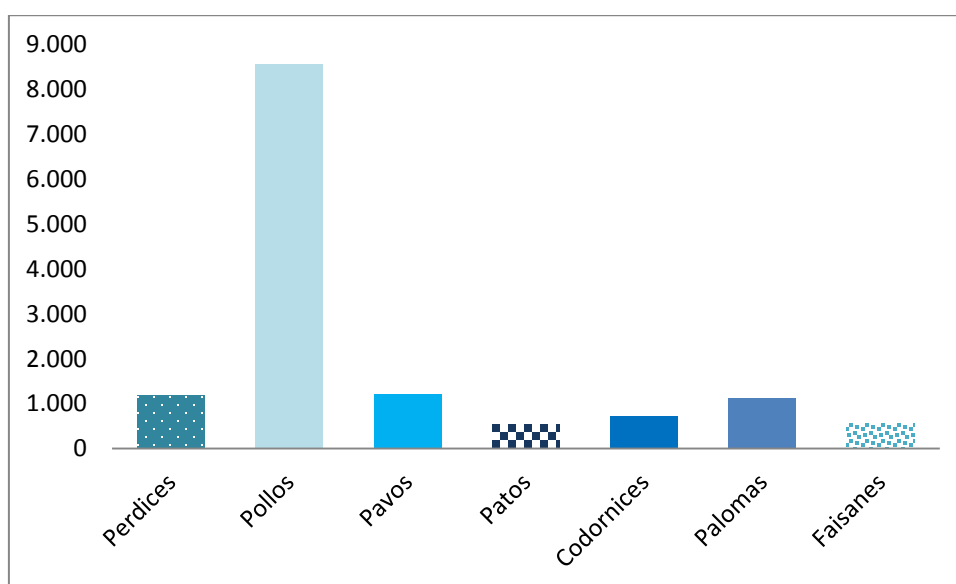


Figura 2.4. Número de las principales explotaciones por especies avícolas en España (REGA, 2013)

2.1.5.3. Comercio exterior

A pesar de que este sector siempre ha tenido un gran potencial productivo, las exportaciones nunca han sido su fuerte debido a que se ha orientado principalmente al mercado del producto fresco, cuya demanda sólo ha podido ser cubierta tradicionalmente por el consumidor nacional. Esto ha dificultado el acceso a mercados exteriores, lo que a su vez ha complicado la gestión de excedentes de producción, y ha producido crisis cíclicas de precios. Sin embargo, esta tendencia parece estar cambiando en los últimos años debido al aumento en la tasa de exportación hacia países de la Unión Europea como Francia y Portugal, destinatarios del 70% de nuestras exportaciones. El incremento en las exportaciones hacia destinos comunitarios ha sido de un 13% en el período 2012/2011, consolidándose por las normas comerciales, que refuerzan el consumo de la carne de ave en fresco, principal fortaleza productiva del sector nacional. En lo que respecta a terceros países, nuestros principales destinos son Benin (34%) y Hong – Kong (17%) Por otra parte, casi la totalidad de las importaciones españolas de carne de ave desde terceros países procede de Brasil (96%). (MAGRAMA, 2013).

2.1.5.4. Precios y consumo

El precio medio de la carne de pollo en 2012 en el mercado español era de 1,86 €/Kg, superior en un 1,6% al de 2011. En Agosto de ese mismo año se produjo una subida (1,96 €/Kg) iniciándose a continuación un descenso sostenido que termina en el año 2012 con unos precios bastante más altos si comparamos con los dos años anteriores. El precio de mercado español resultó ser inferior en un 2,6% a la media comunitaria durante el año 2013 (MAGRAMA, 2013).

Respecto al consumo de aves, en el año 2012, el consumo interior total se calculó en 1.405.900 toneladas, lo que supone un autoabastecimiento del 98,3%. El consumo por habitante y año fue de 29,7 kilogramos, un poco superior al de 2011 (+ 1,0%). En los hogares se ha observado en los últimos años un descenso moderado que concuerda con el aumento de los precios de venta al público. Los datos del año 2012 muestran un repunte ligero, tanto en el consumo (+1,8%), como en el valor del producto consumido (+0,7%), datos que pueden ser considerados satisfactorios. En el resto de productos avícolas, es notable el aumento del consumo de pavo en un 22,7%, aunque gran parte de este consumo se cubre con producto de importación (MAGRAMA, 2013).

2.2. Dietas empleadas en la industria aviar en las diferentes fases de crecimiento del pollo de engorde. Evolución de las mismas

2.2.1. Características y evolución de las dietas avícolas a nivel mundial

En el sistema comercial actual, el alimento es el componente de costo variable más elevado, representando el 65%-70% de los costes de producción. El crecimiento de la producción avícola que se ha dado durante estas últimas décadas ha propiciado que se demanden más piensos y materias primas. La productividad y eficiencia dependen del suministro de alimentos nutricionalmente equilibrados y formulados para satisfacer las

necesidades del pollo. Los pollos de engorde tienen un tracto digestivo relativamente corto y un rápido tránsito de la digestión, por lo que es preciso suministrarles dietas de fácil digestión y ricas en nutrientes. Además, el elevado potencial genético de estas líneas tan productivas solo puede alcanzarse con alimentos altamente proteicos y energéticos. En los pollos, los cambios dietéticos se reflejan rápidamente en el rendimiento productivo. Décadas atrás se tomaban como referentes la bibliografía especializada o los datos de grupos expertos para establecer las necesidades nutricionales; en la actualidad, para la formulación de dietas avícolas, suelen usarse los niveles mínimos recomendados por las empresas de cría que abastecen a los pollitos. Los pollos de engorde necesitan nutrientes, tanto para su metabolismo basal o mantenimiento como para crecer o ganar peso. Para ello se les suministran continuamente energía, proteínas, aminoácidos y ácidos grasos esenciales, minerales, vitaminas y, lo más importante, agua. La energía y los macronutrientes los obtienen a través de alimentos naturales, fundamentalmente cereales y soja, mientras que habitualmente los minerales, vitaminas y aminoácidos esenciales se suministran como suplementos sintéticos (correctores) (FAO, 2013a). Piensos y agua de calidad se ofrecen *ad libitum*, en migaja/gránulo adaptado a las necesidades física y químicamente (FAO, 2014). Últimamente, la tendencia es la de incluir en las dietas administradas granos enteros del cereal en cuestión ya que aparte de disminuir los costes alimentarios, se ha visto que este método tiene efectos positivos sobre el rendimiento productivo y la utilización de nutrientes (Singh y col., 2014).

2.2.2. Requerimientos nutricionales de los pollos de engorde

Energía: los pollitos obtienen energía de los carbohidratos simples, las grasas y las proteínas, mientras que su capacidad para asimilar ciertos carbohidratos complejos tipo fibra es muy limitada. Una dieta con un adecuado nivel de energía es un factor esencial en el modo de formular las dietas para las aves, por lo que sus dietas suelen tener un valor energético alto (habitualmente >3.000kcal/kg) (FAO, 2013a).

Proteínas y aminoácidos: las raciones para broilers suelen contener habitualmente >21% de proteína en las primeras edades. La función de las proteínas alimentarias es proporcionar los aminoácidos necesarios para el mantenimiento, el desarrollo muscular y la síntesis de la proteína del huevo. Veinte son los aminoácidos que necesitan las aves para sintetizar las proteínas de los músculos y los huevos, diez de ellos se consideran esenciales y deben ser suministrados por la ración ya que su organismo no es capaz de sintetizarlos. De entre estos diez, tres de ellos (lisina, metionina y treonina) son los limitantes en la mayoría de las raciones para aves (Ravindran y Bryden., 1999). Estos aminoácidos tienen un papel muy importante a la hora de conseguir pollos de carne de calidad, por lo que merece la pena invertir en ellos a la hora de formular las raciones aunque el coste final sea un poco superior (Kemp y col., 2005). Además, se sabe que cuando el pollito debe enfrentarse a una alimentación con un contenido más bajo en aminoácidos de lo que realmente necesita, le lleva a consumir más energía y a depositar un exceso de grasa en la carne, ya que consume todo lo que le permite la fuente endógena limitante (Gous y col., 1990). Por esta razón, el contenido proteico de la dieta de los pollitos está constantemente monitorizado por la industria alimentaria y se emplea para realizar los convenientes ajustes en la matriz nutricional de las nuevas formulaciones alimentarias (Ravindran y col., 2014).

Relación Proteína: Energía: la energía metabolizable y la digestibilidad de los aminoácidos son parámetros que tienen un efecto crucial en el crecimiento y consecuentemente en el rendimiento productivo del pollo (**Ravindran y col., 2014**). **Eits y col. (2003)** demostraron que la respuesta de los broilers a la proteína dietética depende de factores previos como la nutrición proteica que se les haya administrado y el sexo de los mismos, y sugieren que los niveles de proteína en raciones de crecimiento y de finalización deberían optimizarse de manera simultánea, no de manera independiente como suele ser lo habitual. El consumo de alimento por un animal dictará la cantidad de proteína y lípidos que depositará cada día. La dieta administrada debe contener un ratio proteína: energía adecuado para maximizar el crecimiento proteico, valores excesivos tanto de proteína como de grasa en la dieta llevarán a una ingesta de alimento reducida resultando en una disminución del aporte energético necesario para crecer, por tanto, deberán mobilizarse las reservas endógenas de lípidos (Emmans; 1981). Gous y col. (2012) demostraron que tras un período de restricción proteica, los pollos machos genéticamente predispuestos a acumular grasa experimentaron un aumento en el crecimiento, mientras que los pollos hembra demostraron una mejor eficiencia a la hora de transformar la dieta. Estos autores concluyeron que los broilers a los que se les suministran dietas deficitarias en algún nutriente cambian su ratio lípido: proteína consumiendo más lípidos de los necesarios en situaciones normales ya que los utilizan como la fuente de energía que les falta. Por tanto, la formulación proteica en la dieta de los pollos debe realizarse teniendo en cuenta las distintas necesidades que se presentan en las fases de crecimiento planteadas para todos los nutrientes que componen las raciones.

Grasas y ácidos grasos: la cantidad incluida en la ración es habitualmente de un 3-5%. Además de favorecer el aporte energético, la grasa permite controlar los piensos pulverulentos y mejorar la palatabilidad la ración. El ácido linoleico es el único que se considera fundamental en la dieta (FAO, 2013a).

Minerales: las funciones que desempeñan son vitales y muy variadas tales como la formación del hueso, el metabolismo basal y el mantenimiento del equilibrio ácido-base y electrolítico de las membranas celulares. Ca y P fundamentalmente mantienen el esqueleto en buen estado, y dado el rápido crecimiento de estos animales es muy crítico que las raciones contengan niveles adecuados de estos nutrientes para que el desarrollo óseo no se vea comprometido. El P utilizable es el que se presenta en los componentes vegetales de las dietas en forma de fósforo no fitato o asimilable. La relación Ca: P no fitato en las dietas ha de ser de 2:1 para una adecuada absorción de estos dos minerales. En el caso del sodio, potasio y cloruro deben estar bien proporcionados para evitar un desequilibrio ácido- base, ya que este podría conllevar a una alteración del pH fisiológico y de determinados procesos metabólicos como crecimiento, desarrollo óseo, hidratación corporal y utilización de aminoácidos, lo que llevaría a una reducción en el rendimiento del pollito (Blair, 2008). Los oligoelementos como el cobre, el yodo o el hierro funcionan básicamente como coenzimas de las reacciones metabólicas y se requieren en la dieta en muy baja cantidad. Las dietas de los pollitos de engorde deben ser suplementadas habitualmente en este tipo de nutrientes ya que las dietas basales suelen carecer de ellos (NRC, 1994; Blair, 2008).

Vitaminas: tanto las de tipo liposoluble como las de tipo hidrosoluble deben añadirse en el pienso. La vitamina C es un caso excepcional ya que las aves la sintetizan por ellas mismas.

Estos elementos son de vital importancia ya que actúan como mediadores o participan en todos los procesos bioquímicos del organismo (NRC, 1994).

Agua: es sin duda un elemento clave en nutrición aviar. Por una parte, la limitación en la disponibilidad de agua disminuye la ingesta y es imprescindible en la absorción de nutrientes, excretar sustancias de desecho y regular la temperatura corporal. El agua supone el 80% del cuerpo, y las aves están constantemente bebiendo y comiendo por lo que no se les puede privar de agua ya que la producción de las mismas y su crecimiento se verían seriamente afectados. Aunque muchos factores influyen en la necesidad de agua, en la mayoría de los casos se considera el doble que el alimento. Hay que asegurarse de que el agua sea de buena calidad y no arrastre microorganismos en cantidades excesivas ni productos químicos contaminantes (FAO, 2013a).

NUTRIENTE	UNIDAD	Inicio (10 días)	Crecimiento (11-22 días)	Finalización (23-42 días)
Energía metabolizable *	Kcal/Kg	3200	3200	3200
Proteína bruta	%	21-22	19-20	18-19
Arginina	%	1.38	1.25	1.13
Glicina + Serina *	%	1.25	1.14	0.97
Histidina *	%	0.35	0.32	0.27
Isoleucina *	%	0.80	0.73	0.62
Leucina *	%	1.20	1.09	0.93
Lisina	%	1.32	1.19	1.05
Metionina	%	0.50	0.48	0.43
Metionina+ Cisteína	%	0.98	0.89	0.82
Fenilalanina *	%	0.72	0.65	0.56
Fenilalanina+ tirosina *	%	1.34	1.22	1.04
Treonina	%	0.86	0.78	0.71
Triptófano	%	0.20	0.19	0.19
Valina	%	1.00	0.91	0.81
Ácido linoleico	%	1.00	1.00	1.00
Calcio	%	0.90	0.84	0.76
Cloro	%	0.25	0.24	0.23
Fósforo no fitato	%	0.45	0.42	0.38
Potasio	%	0.78	0.72	0.70
Sodio	%	0.19	0.19	0.18
Cobre	mg	15	15	15
Yodo	mg	1	1	1
Hierro	mg	40	40	40
Manganeso	mg	100	100	100
Selenio	mg	0.35	0.35	0.35
Zinc	mg	100	100	100

Tabla 2.2. Requerimientos nutricionales para pollos de engorde. Cobb- vantress.com, 2012

* NRC, 1994

2.2.2.1. Requerimientos nutricionales principales de los pollos de engorde

De acuerdo con Lázaro y Mateos (2008), es importante prestar especial atención a la forma de presentación del pienso, ya que la presentación en migas o microgránulo mejoran el consumo hasta en un 15-25% con diferencias más notables en los primeros 25 días de vida (Amerah y col., 2007a, b; Mateos y col., 2007; Corchero y col., 2008). En pollos de hasta dos semanas de edad el pollito debe comer en forma de microgránulos no superiores a 2mm de diámetro; mientras que a partir de los 25 días este gránulo puede tener un diámetro de 3-3,5mm.

Energía: valores mínimos de 2.870kcal AMEn/Kg y 3.030 AMEn/Kg, mínimo en dietas de iniciación y finalización respectivamente.

Hidratos de Carbono: suministrados básicamente en forma de almidón en el pienso a lo largo de toda la vida del pollito, han de estar en torno al 35% de la dieta.

Proteína Bruta: se recomiendan como máximo cantidades en torno al 20,5% en pienso de inicio y en torno al 17,5% a partir de las tres semanas de edad. Los aminoácidos esenciales, según Bedford y Summers (1985), han de tener un equilibrio con los no esenciales, siendo los primeros aprox. un 55% y los segundos un 45% en el total proteico de la dieta.

Fibra bruta: no se recomienda que las dietas tengan menos de un 2,1% de fibra ya que esto conllevaría una reducción en el tamaño de la molleja y produciría una disminución en la motilidad afectando negativamente a la salud intestinal del pollito (Mateos y col., 2006 a, b).

Ácidos grasos esenciales: el ácido linoleico constituye un elemento dietético muy importante a la hora del adecuado crecimiento del pollito, considerándose óptimo una cantidad no inferior al 0,7% en la dieta, siendo el doble en piensos de iniciación y aproximadamente la mitad en piensos de finalización.

Minerales: el calcio tiene un límite inferior de un 0,6% en dieta y el fósforo digestible de un 0,3% cuando los pollitos han superado los 28 días de edad, mientras que en el pienso de iniciación estas recomendaciones se doblan. Vieira y col. (2003) proponen en pollos de carne de 1 a 21 días de edad una relación sodio: potasio: cloro superior a 200 mili-equivalentes por kilogramo de dieta.

Vitaminas: el nivel de vitamina E podría aumentarse a una cantidad de 20 UI en las dos últimas semanas de vida para mejorar el aspecto y la calidad de la canal en el lineal de la gran superficie. Las vitaminas del grupo B deben administrarse en los piensos de inicio desde los 16 µg/kg de dieta de la cobalamina a los 6 mg/kg de dieta de la riboflavina, mientras que en los piensos de finalización estas cantidades son aproximadamente la mitad. La vitamina C ayuda en el rendimiento productivo del broiler en situaciones de estrés por temperatura ambiental además de favorecer en condiciones normales el crecimiento, la eficiencia alimentaria y la supervivencia del animal, recomendándose unas cantidades de 250 mg/kg de dieta (Gous, 2010). También se ha comprobado que la combinación de las vitaminas liposolubles de tipo A y E resulta muy útil al mejorar el efecto del estrés por alta temperatura, que desemboca en mayor peroxidación lipídica y daño tisular en broilers (Sahin y col., 2002; Whitehead y Keller, 2003).

NUTRIENTE	UNIDAD	0-18 DÍAS	18-35 DÍAS	MÁS DE 35 DÍAS
Vitamina A	10 ³ UI	11	9	7
Vitamina D ₃	10 ³ UI	3.5	2.8	2
Vitamina E	UI	35	26	20
Tiamina	mg/kg	1.8	1.3	0.3
Riboflavina	mg/kg	6	5.5	3
Piridoxina	mg/kg	2.8	2.4	0.6
Cobalamina	mg/kg	16	15	8
Ácido fólico	mg/kg	1	0.7	0.30
Niacina	mg/kg	46	35	20
Ácido pantoténico	mg/kg	12	10	8
Biotina	mg/kg	120	95	20
Colina	mg/kg	320	250	175
Fe	mg/kg	32	27	20
Cu	mg/kg	7	6	4
Zn	mg/kg	72	62	52
Vitamina K ₃	mg/kg	2.5	2.2	1.7

Tabla 2.3. Recomendaciones prácticas de vitaminas y microminerales para pollos de carne (Lázaro y Mateos, 2008)

2.2.3. Fases de crecimiento de los pollitos y sus diferentes dietas a nivel mundial

En las primeras semanas, los piensos se basan en un alto contenido energético, proteico y de aminoácidos, ya que las necesidades nutricionales en los pollos jóvenes son muy altas. En estas dietas de iniciación se incorpora habitualmente alrededor de un 8% de harina de pescado como aporte de proteína de alto valor biológico. En las últimas semanas, el pienso pasa a ser menos energético y con menos oligoelementos y aminoácidos esenciales, el contenido en ingredientes ricos en proteína vegetal aumenta, disminuyendo el de ingredientes ricos en proteína animal (harina de pescado) de la cual tan sólo se incorpora una cantidad inferior al 4% (dietas de finalización o retirada) (FAO, 2013a). También hay que tener en cuenta el hecho de que los pollos adultos digieren mejor las grasas que los jóvenes; por tanto, hay que prestar especial atención a la forma de administrarlas y que éstas sean de alto valor nutricional (Blair, 2008).

2.2.4. Principales ingredientes que se incluyen en las dietas de los pollos de engorde a nivel mundial

Fuentes de energía: el maíz es la más empleada, tiene a su favor que su energía de origen procede del almidón, el cual es muy digestible para las aves; además tiene una elevada palatabilidad y está libre de factores antinutricionales. A pesar de esto, en otros países se emplean trigo y sorgo, este último debido, sobre todo, a su menor coste y mayor disponibilidad. También se ha visto en estudios recientes en pollos alimentados con estas raciones una posible reducción de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*,

que incluye microorganismos considerados potencialmente patógenos (Lunedo y col., 2014). Por otra parte, los carbohidratos complejos tipo celulosa que están incluidos en plantas y representan la fuente de fibra de las mismas son en muy limitada medida digeridos por las aves. Aunque existe una pequeña hidrólisis de celulosa en los ciegos de ciertas especies de aves, la energía procedente de la fibra es muy limitada comparada con el total (Blair, 2008). Más recientemente se está estudiando el empleo del centeno como fuente de energía en raciones para pollitos, pero tiene ciertos inconvenientes que son difíciles de sortear, tales como el aumento de la viscosidad intestinal (β -glucanos) y problemas de mineralización del hueso, entre otros (Tellez y col., 2014).

Fuentes de proteína vegetal: la harina de soja, aportando el 70% de la proteína de la dieta, es con diferencia la más usada a nivel mundial por su gran aceptabilidad y por sus múltiples ventajas respecto a otras harinas de semillas oleaginosas: adecuado balance de aminoácidos esenciales, que es necesario para complementar las dietas avícolas basadas en cereales, alta disponibilidad de aminoácidos (Ravindran y col., 2014), y mayor contenido de energía metabolizable. Por otra parte, los factores antinutricionales que contiene la soja cruda quedan destruidos en su mayor parte en el tratamiento térmico durante la elaboración de la harina de soja. A pesar de todo esto, en algunos países se utilizan también las harinas de colza, guisante y girasol (Ensminger y col., 1990; Kellems y Church, 2010).

Fuentes de proteína animal: se emplean fundamentalmente para equilibrar el contenido en aminoácidos de la dieta. La harina de pescado o la de carne son las fuentes más utilizadas en las dietas avícolas. La harina de pescado provee a la dieta de proteínas de alto valor biológico. Por otra parte, la cantidad de minerales que proporciona es elevada incluyendo calcio, fósforo y oligoelementos, también vitaminas del grupo B y ácidos grasos esenciales. La harina de carne se considera de menor calidad que la harina de pescado o la harina de soja. De acuerdo con la legislación actual, los niveles de este tipo de harina no deben ser superiores en dieta al 10% de la ración (Ensminger y col., 1990; Kellems y Church, 2010). En el caso de la UE el uso de la harina de carne para la fabricación de los piensos se rige de acuerdo al Reglamento (EC n° 178/2002), mediante el cual se garantiza el estado sanitario y la seguridad en todas las etapas de la cadena alimentaria. Como consecuencia de la crisis alimentaria de los años noventa representada por la epidemia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), se ha aumentado la precaución en cuanto al riesgo que desempeñan los subproductos animales en la propagación de las enfermedades animales transmisibles. Este reglamento señala las medidas que deben aplicarse para evitar este tipo de patologías a la hora de elaborar los piensos para animales de granja que van a consumirse posteriormente, restringiendo el uso de las proteínas animales a aquellas que cumplan determinadas disposiciones.

2.2.5. Avances en nutrición aviar a nivel mundial

La investigación en temas de nutrición para aves se centra en este momento fundamentalmente en mejorar la utilización nutritiva de los nutrientes para que sea más eficaz, en reducir costos, maximizar la eficacia económica y en mejorar la calidad sanitaria de los productos. Las raciones ajustadas para satisfacer de manera más adecuada las necesidades de las aves contribuyen a optimizar la eficacia de la utilización de nutrientes. La mayoría de los piensos para aves se someten a tratamientos térmicos como la extrusión o la granulación para

facilitar la ingesta porque de esta forma los pollitos invierten menos tiempo en comer, desperdician menos comida y además este tipo de pienso es más rico en nutrientes disponibles y menos atacado por microorganismos. Otro avance relativamente reciente es el que ha supuesto la alimentación a base de granos enteros (trigo o cebada) junto con un alimento concentrado balanceado, lo que beneficia al animal en sentido productivo y sanitario debido a que la molleja se desarrolla y el proventrículo aumenta sus secreciones; este método consiste en mezclar algunos granos (del 10 al 25%) en el pienso balanceado (Ravindran y Bryden., 1999; Scanes y col., 2004; Leeson y Summers, 2005).

2.3. Evaluación de la digestibilidad y parámetros relacionados en pollos de engorde

2.3.1. Concepto de digestibilidad. Relevancia y utilidad de este parámetro

Se considera digestibilidad a la porción de cada nutriente procedente del alimento consumido y digerido que es absorbido por el sistema gastrointestinal y, por tanto, no aparece en el contenido intestinal o fecal (Stein, 2007). La digestibilidad de un alimento se expresa por medio de su coeficiente de digestibilidad (Scott y Boldaji, 1997). En los estudios de digestibilidad se mide la cantidad de nutriente presente en el alimento y se compara con la cantidad del mismo nutriente presente en las heces del animal (digestibilidad fecal), o en el íleon (digestibilidad ileal). En este tipo de estudios es fundamental conocer la composición química exacta del alimento así como la cantidad exacta suministrada y excretada (Jull, 1953). Cada alimento que compone la ración del pollo tiene sus propios coeficientes de digestibilidad para todos los nutrientes que lo componen ya que la digestibilidad puede medirse para cada uno de ellos (Blair, 2008). La digestibilidad varía en función de factores relacionados con el alimento y otros relacionados con los animales que lo consumen. En general, la digestibilidad de los granos de cereales y otras fuentes de azúcares o almidones es elevada para todas las especies de animales en explotaciones ganaderas, y en el caso de cerdos y aves se digieren mejor aquellos alimentos ricos en almidón y proteínas y bajos en grasa (Brautigan, 1991).

Esta herramienta se utiliza como una medida para evaluar la calidad de la dieta administrada y de las materias primas incorporadas en ella, la disponibilidad de los nutrientes que las constituyen, la importancia que tienen estos en la salud de los animales, su utilización y las características de las heces, también es un instrumento con el que se pueden ajustar las dietas que se administran a los animales y de esta forma estimar las necesidades dietéticas y los requerimientos. Se necesitan datos precisos para predecir el comportamiento de los ingredientes alimentarios de manera individual para una correcta formulación. Ya que no es posible evaluar cada fuente alimentaria en los estudios animales, los ensayos de digestibilidad por comparación de ingredientes son ampliamente utilizados para estimar la calidad. Esta hipótesis es particularmente cierto cuando se analiza la biodisponibilidad de aminoácidos (Harmon, 2007). De acuerdo con Batal y Parsons (2002), la digestibilidad aumenta en los pollitos aumenta de manera directamente proporcional a su edad en dos factores clave como son la utilización de la energía que proporciona la dieta y la absorción de los aminoácidos esenciales de la ración.

Para valorar la digestibilidad de un alimento es necesario tener en cuenta ciertos aspectos que pueden afectar a los resultados, como por ejemplo la especie vegetal o animal a la que pertenece el ingrediente, el procesamiento, la interacción entre los nutrientes de la dieta o ingrediente, el método analítico utilizado para determinar los valores de digestibilidad, así como también los factores ambientales y propios del individuo (Adesogan y col., 1998; Calabró y col., 2006; Julliand y col., 2006). Si no se consideran los aspectos anteriormente citados se puede subvalorar o sobrevalorar el valor nutritivo de un ingrediente y así cometer errores al balancear la dieta, con efectos negativos sobre la salud y la producción de los animales que la consumen (Bauer y col., 2001; Secombe y Lester, 2012). Hay que aclarar que la composición química de un alimento es solamente indicativa del contenido de nutrientes del mismo, pero no de su disponibilidad para el animal, por lo que es necesario contar además con datos de digestibilidad (Brautigam, 1991). Por tanto, un mejor conocimiento de los requerimientos energéticos y de las eficiencias a la hora de utilizar la energía para el depósito de grasa y proteína, es muy importante para formular dietas que promuevan la reducción del depósito corporal de grasa en pollos de engorde con fines comerciales.

La estimación de los coeficientes relacionados con la digestibilidad y absorción de nutrientes no solamente ayuda a desarrollar modelos para estimar los requerimientos energéticos, sino que también facilita la comprensión del metabolismo energético (Sakomura y col., 2005). Finalmente, la aplicación de este concepto no se limita a los nutrientes presentes en la ración o en la dieta, sino que puede aplicarse válidamente al cálculo de la supervivencia digestiva de sustancias activas presentes en el alimento. De este modo puede evaluarse por ejemplo qué proporción de un determinado compuesto presente o añadido al alimento puede alcanzar los tramos finales del intestino grueso para llevar a cabo una determinada función prebiótica. Este procedimiento se ha utilizado tanto en animales de laboratorio (Hernández-Hernández y col., 2012) como en los de producción (Clemente y col., 2008)

2.3.2. Métodos para determinar la digestibilidad

Para este cometido existen métodos *in vivo*, ya sean directos como la recogida total de heces, o indirectos en los que se usan indicadores, y métodos *in vitro* en los cuales se usan enzimas y técnicas de fermentación. Los diferentes métodos varían en precisión y mecanismos empleados para determinar los coeficientes de digestibilidad (Osorio- Carmona y col., 2012).

Métodos *in vitro*: aunque existen multitud de técnicas para determinar la digestibilidad a nivel de laboratorio, sin embargo, el más empleado es el método enzimático, el cual permite predecir la digestibilidad de las materias primas o de las dietas en el intestino de los animales al someter a los alimentos evaluados a una serie de pasajes por compuestos enzimáticos, que simulan la degradación que ocurre dentro del organismo vivo teniendo en cuenta los segmentos del tracto gastrointestinal (Hervera y col., 2007; Castrillo y col., 2009; Coles y col., 2011). Las muestras molidas del alimento a evaluar comprenden pesos de 0,5-1 g y con un diámetro de partícula menor a 1 mm y se deben depositar en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, en cada serie de muestras se incluye un blanco (Hervera y col, 2007; Lankhorst y col, 2007; Coles y col, 2011).

Métodos *in vivo*:

- Métodos directos: en este tipo de técnicas se emplean normalmente animales en la investigación y se recogen todas las heces producidas (Burrows y col., 1982; De Brito y col., 2010; Fortes y col., 2010). Primero se establecen los requerimientos nutricionales del animal según la raza, fase de desarrollo y estado fisiológico, después, se formulan las dietas con las materias primas a evaluar y se procuran a los animales durante al menos cinco días como período de adaptación, antes de dar inicio al periodo experimental (fase de recogida de excretas), que puede ser de tres a cinco días (Gröner y Pfeffer, 1997; Silvio y col., 2000; Cavalari y col., 2006).
- Métodos indirectos: la recogida total de excretas en ensayos con animales de producción supone una complicación práctica considerable. La finalidad de los métodos indirectos consiste por tanto en poder determinar la digestibilidad de sustancias sin tener que realizar una recogida total de excretas. Para ello se utilizan los llamados indicadores. Estos son compuestos de referencia empleados para monitorizar aspectos químicos y físicos de la digestión, calcular el flujo del bolo alimenticio, establecer la digestibilidad parcial o total y la producción fecal en numerosas especies animales. Los indicadores minimizan la interferencia con los patrones de comportamiento animal y simplifican los procedimientos (Rodríguez y col., 2007). Un indicador debe ser inerte y no tóxico, no desarrollar ninguna función fisiológica, no participar en procesos de absorción o metabolismo, integrarse bien en la mezcla alimentaria y permanecer uniformemente distribuido en el producto de la digestión, no afectar a las secreciones intestinales, absorción o motilidad, no influenciar la microflora del tracto digestivo y poseer un método específico de determinación analítica (Owen y Hanson, 1992). El uso de estas sustancias exige su cuantificación en las heces o en el contenido intestinal. A medida que el alimento avanza por el GIT, la concentración del indicador aumenta progresivamente debido a la dilución de otros constituyentes del alimento por digestión y absorción. Por tanto, el aumento en la concentración es proporcional a la digestibilidad de los componentes del alimento. Empleando este método, con una muestra de 100 g de heces es suficiente para calcular el contenido del indicador y realizar los demás análisis bromatológicos de éstas, lo que facilita en gran medida la realización de los experimentos. La elección de un indicador debe ser primariamente basada en su tasa de recuperación fecal (Rodríguez y col., 2007); lo ideal es que sea $\geq 98\%$, lo que garantiza la precisión de los resultados obtenidos (Kavanagh y col., 2001; Harmon, 2007).

El óxido de cromo fue propuesto como indicador en 1918 y desde entonces es el que más se usa para ensayos de digestibilidad (Rodríguez y col., 2007). Normalmente se adiciona a la dietas en concentraciones que varían de 1-5 g/ kg de alimento (Kavanagh y col., 2001; Carciofi y col., 2007). Se trata de un compuesto químico de color verde fijo, insoluble en agua, alcohol y acetona y no tóxico, se incorpora fácilmente en las dietas, pudiendo ser analizado con relativa facilidad (Titgemeyer, 1997). La mayor limitación de los marcadores externos como el crómico es que no se comporta como las partículas del alimento y cuando se adhieren a su porción fibrosa, pueden alterar algunas características químicas y físicas (Rodríguez y col., 2007). Otros compuestos utilizados son el dióxido de titanio, también un marcador externo que hay que añadir a

la dieta (Kavanagh y col., 2001), también los n-alcenos, compuestos naturales procedentes de la cera cuticular de vegetales, la fibra indigestible y las cenizas ácido insolubles, un marcador natural presente en las dietas que se formulan a base de cereales; estos dos últimos constituyen indicadores internos (Rodríguez y col., 2007).

La pauta que se sigue habitualmente en los ensayos de digestibilidad (figura 2.5) consiste en administrar la dieta al animal en ensayo durante un período de tiempo que se conoce como período de adaptación y dura aproximadamente una semana, tras este período se adiciona el indicador durante 3 días y pasado este tiempo se recolectan las heces durante otros tres días, para la obtención de los datos de digestibilidad (Osorio- Carmona y col., 2012).

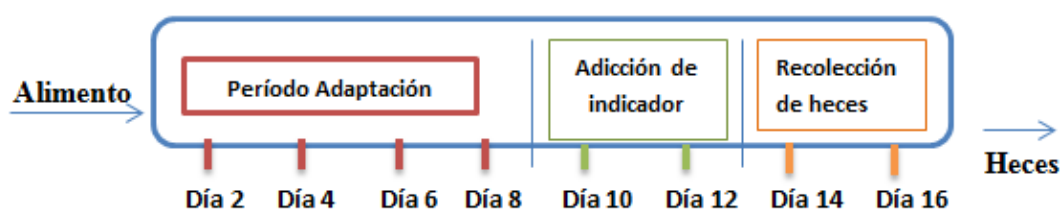


Figura 2.5. Método *in vivo*, mediante indicador indirecto, para determinar la digestibilidad (Adaptado de Osorio-Carmona y col., 2012)

2.3.3. Digestibilidad aparente y verdadera

Digestibilidad aparente: se denomina aparente al cálculo de la digestibilidad sin tener en cuenta las sustancias presentes en el contenido ileal y fecal proceden de los fluidos y la mucina que secreta el intestino y los órganos que lo rodean y también materia celular que se desprende de la pared intestinal al pasar el bolo alimenticio (Blair, 2008). Para su cálculo se utiliza la expresión:

$$\text{CDA} = \frac{[(\text{Na}/\text{Ia}) - (\text{Ne}/\text{Ne})] / (\text{Na}/\text{Ia}) \times 100$$

Donde CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente. Na: Concentración del nutriente en el alimento. Ne: Concentración nutriente excretado en heces (digestibilidad aparente fecal) o íleon (digestibilidad aparente ileal). Ia: Concentración del indicador en el alimento. Ie: Concentración del indicador en heces (digestibilidad aparente fecal) o íleon (digestibilidad aparente ileal) (Rubio, 2005)

Digestibilidad verdadera: Con el fin de obtener información más aproximada al verdadero aprovechamiento de los nutrientes por parte del animal, se establece este concepto en el cual se tienen en cuenta en los cálculos los valores endógenos ya que parte de los nutrientes que se encuentran en heces o intestino proceden del animal y no son residuos del alimento. Los procedimientos más habituales se basan en el suministro a los animales de una ración experimental que no contiene el nutriente de interés para el estudio de su excreción endógena, por tanto la cantidad que aparecerá en heces representa dicha excreción (Maynard, 1986). Para su cálculo se utiliza la expresión:

$$\text{CDV} = \frac{[(\text{Na}/\text{Ia}) - (\text{Ne} - \text{Nen} / \text{Ia})]}{(\text{Na} / \text{Ia})}$$

Donde CDV: Coeficiente de digestibilidad verdadera. Na: Concentración del nutriente en el alimento. Ne: Concentración nutriente excretado en heces (digestibilidad verdadera fecal) o íleon (digestibilidad verdadera ileal). Nen: Concentración nutriente excretado en heces (digestibilidad verdadera fecal) o íleon (digestibilidad verdadera ileal) utilizando la ración proteínopriva; Ia: Concentración del indicador en el alimento. Ie: Concentración del indicador en heces (digestibilidad verdadera fecal) o íleon (digestibilidad verdadera ileal) (Rubio, 2005)

Los datos sobre digestibilidad están sujetos a determinadas limitaciones en el caso de las aves, ya que éstas excretan heces y orina de manera conjunta (Hill y Anderson, 1958). Para corregirlo, se utilizan valores corregidos para nitrógeno indicados más abajo.

2.3.4. Energía

El método tradicional para expresar el valor energético de un alimento es el que utiliza calorías (cal), tanto para dar a conocer el contenido energético de un ingrediente (expresado como Kcal/g), como para expresar los requerimientos que tienen los animales. Desde hace unos años tiende a expresarse en unidades de trabajo (megajulios, MJ), equivaliendo 1 julio a 0,2388 calorías (Shimada, 2005).

Energía bruta (GE): energía que desprende un alimento al ser quemado totalmente. Para su determinación se utiliza la bomba calorimétrica (Shimada, 2005).

Energía digestible (ED): si al valor de GE se le descuenta la energía contenida en las heces, se obtiene el valor de ED, que es un mejor indicador de la energía disponible para el animal. Se diferencia de la ME en que esta última tiene en cuenta también las pérdidas por la orina y los gases producidos durante la digestión y excreción (Brautigan, 1991; Shimada, 2005).

Energía metabolizable aparente (AME y AMEn): no tiene en cuenta las pérdidas de carácter endógeno que no proceden directamente del alimento ingerido, a saber, secreciones digestivas, descamaciones intestinales, cuerpos bacterianos, constituyentes nitrogenados procedentes del catabolismo de proteínas y otras. Por esta razón, esta medida tiende a subestimar el valor energético de los alimentos cuando hay baja ingesta de alimentos, ya que en los excrementos hay un alto contenido de origen endógeno. Por otra parte, la AME no permite generar comparaciones entre aves de diferentes niveles productivos o distintas retenciones proteicas. Por esta razón se utiliza una corrección de estos métodos para la retención nitrogenada, permitiendo así comparar diferentes animales y mejorando la precisión de estas medidas. Para esto se debe hacer una determinación del balance nitrogenado analizando el contenido de éste en el alimento y en las heces. Para calcular la AME a balance nitrogenado cero (AMEn), se debe considerar al ácido úrico como principal constituyente de nitrógeno excretado en la orina y que 1g de nitrógeno excretado como ácido úrico equivale a 8,22 Kcal (Lessire, 2004).

Energía metabolizable verdadera (EMV): es la medida convencional del contenido de energía disponible en los ingredientes de los alimentos para cubrir las necesidades de los animales. Tiene en cuenta las pérdidas de energía en las heces y la orina. Para su determinación se mide el consumo de alimento, la producción de excreta y la energía de combustión (energía bruta)

de ambos (Hill y Anderson, 1958). Si se utiliza un marcador indigestible, no es necesario medir ni la cantidad total de pienso consumido ni la de heces excretadas. Para su cálculo se utiliza la expresión:

$$\text{EMV} = (\text{EBi} - (\text{EBe} - \text{EE})) / \text{Qa} = (\text{AME} + \text{EE}) / \text{Qa}.$$

Donde EMV: Energía metabolizable verdadera. EBi es la Energía bruta ingerida. EBe es la Energía bruta excretada. EE es la energía endógena excretada durante el balance digestivo. Qa es la cantidad de alimento ingerido por el animal. AME: Energía metabolizable aparente (Lessire, 2004).

Las estimaciones de los requerimientos de este tipo de energía establecidas para el crecimiento del pollito deben realizarse con precaución ya que existen numerosas variaciones en la composición corporal, el índice de crecimiento y el depósito de proteína y grasa de acuerdo con la genética, la edad y el entorno donde los animales son criados (Sakomura y col., 2005). Cualquier disminución en el contenido energético, o aumento en el contenido proteico de la dieta, resultará en un detrimento en la eficiencia con que cada proteína es empleada por los pollitos. Cuando se mide el nitrógeno fecal, se sabe que a más excreción de nitrógeno, menos valor biológico de la proteína (Gous, 2010).

Energía neta (EN): el metabolismo o utilización de la energía que está presente en un alimento produce un incremento calórico que es desaprovechado por el animal. La resta de este valor del dato de ME, nos representa la energía neta (Shimada, 2005). Para su cuantificación se utilizan las llamadas cámaras de respirometría. La respirometría es la medición del intercambio gaseoso entre el animal y el medio ambiente. El método empleado con mayor frecuencia se basa en la medición del índice de consumo de O₂ de un animal (Hill y Wise, 2006)

2.3.5. Fibra y compuestos no digestibles

Las materias primas más frecuentemente usadas en la formulación de alimentos (soja, cereales) para monogástricos, contienen sustancias como los polisacáridos no amiláceos (NSP) (Englyst, 1982), y los oligosacáridos presentes en la harina de soja y otras materias primas fibrosas. La cuantificación de estas sustancias es de gran relevancia a la hora de determinar la digestibilidad, ya que al crear un entorno viscoso en el lumen intestinal tienden a dificultar la digestión, lo que se refleja finalmente en una disminución en el aprovechamiento de la ración (Choct y Annison, 1992; Choct y col., 1996; Smith y Annison, 1996). Por otro lado, la evaluación del contenido y digestibilidad de las fracciones fibrosas de los alimentos es de gran interés nutricional (Shimada, 2005).

Se denomina fibra neutro detergente (NDF) a la fracción que contiene principalmente los componentes de la pared de los vegetales. La determinación se realiza mediante el sometimiento de la muestra a un detergente neutro a cierta temperatura, obteniéndose un residuo insoluble, compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La fibra ácido detergente (ADF) se obtiene tras la aplicación de un detergente ácido en el que se disuelve el contenido celular y la hemicelulosa, obteniéndose un residuo insoluble compuesto principalmente por celulosa y lignina. Si a la NDF le restamos la ADF, obtenemos por diferencia el contenido de hemicelulosa de la muestra analizada. Por último se determina la lignina ácido detergente (LAD), sometiendo el residuo de ADF a la acción del ácido sulfúrico que provoca la

oxidación de sus componentes a excepción de la lignina. Si a la ADF le restamos la LAD obtenemos por diferencia el contenido de celulosa de la muestra analizada (Mora, 2002).

2.4. Estudio del pollo tipo broiler desde el punto de vista nutricional

2.4.1. Características del pollo broiler

El término broiler se emplea para referirse a un animal joven perteneciente al grupo de las aves, ya sea hembra o macho que procede de un cruce genéticamente seleccionado para conseguir una óptima velocidad de crecimiento y un mejor rendimiento de la canal, y que además cuenta con la formación de grandes masas musculares. El broiler tiene una gran ventaja debido a su ciclo de producción muy rápido, de seis a siete semanas, y de ahí que se haya convertido en la base de la producción masiva de carne de ave (Yagüe, 2005). Con 1,8-2 kg de peso el broiler ya está listo para ser sacrificado, alcanzando con ese peso su máximo de rendimiento. La raza a la que pertenecen los actuales broilers procede del cruce de pollos Cornish y White Rock, con gran velocidad de crecimiento, capaces de alcanzar una media de hasta setenta gramos diarios en la etapa de 1 a 42 días de edad. La selección intensiva que ha tenido lugar durante las últimas seis o siete décadas ha dado lugar a pollos de engorde que transforman de manera muy eficaz el alimento en masa corporal, lo que hace de ellos los animales agrícolas más eficientes (Stanley y col., 2014). Como se indicó arriba (ver página 7), el índice de transformación de estos animales se sitúa en torno a 1,8 (kg de pienso para producir un kg de carne) (FAO, 2010).

2.4.2. Sistema gastrointestinal

El GIT es un sistema muy especializado en forma de tubo que se desarrolla desde la boca hasta el ano, cuya misión más importante es la de la digestión de la componentes alimentarios en sus más básicos componentes para su absorción y utilización del organismo que habite (Zoetendal y col., 2004). El desarrollo embrionario temprano de las diferentes regiones del GIT comprende el establecimiento de una estructura que va desde la zona más proximal a la zona más distal conteniendo en su interior un revestimiento de membrana mucosa y un recubrimiento exterior de capas musculares separadas por tejido conectivo (Grand y col., 1976; Sell y col., 1991). Una vez que el individuo es adulto, el GIT es una estructura compleja que se divide en esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (ciego, colon y recto). Cada región cuenta con diferente histología y estructura anatómica en función de su labor en el proceso de la digestión (Chivers y col., 1980; Van de Graaff., 1986).

Las aves han tenido que adaptar la anatomía de su aparato digestivo para el vuelo (Duke, 1997). A consecuencia de este hecho, el GIT de las aves (figura 2.6) es bastante diferente al de los mamíferos con intestinos más pequeños y tiempos de tránsito de la digestión más cortos. Sin embargo, no por ello son menos eficientes en cuanto a digestión se refiere. Esto se explica en gran parte por el hecho de que el GIT del pollo es el hábitat ideal de una comunidad microbiana muy compleja que ayuda enormemente en este proceso (McWhorter y col., 2009). El GIT en las aves se subdivide en las siguientes regiones anatómicas:

pico, esófago, buche, proventrículo, molleja, intestino delgado, intestino grueso y ciegos. El pico y, en la mayoría de las especies aviarias, las dos regiones estomacales (proventrículo glandular y molleja muscular), hacen a las aves diferentes, tanto anatómica como fisiológicamente, de otros animales no rumiantes (Józefiak y col., 2004). Podría decirse que el intestino delgado es la porción más relevante en cuanto a digestión de los componentes de la dieta y absorción de nutrientes. Por otra parte, el intestino grueso y los ciegos albergan la mayor proporción en cuanto a flora digestiva se refiere, siendo cruciales en la colonización microbiana del bolo alimenticio que llega a ellos. En este sentido, es de destacar el ciego, en relación con el cual existe gran controversia respecto a su naturaleza, función y anatomía en cada una de las especies aviarias. El ciego está presente en todas las aves domésticas, pero, en algunas especies salvajes se pierde (McLelland, 1989). Tanto la forma como el tamaño y la capacidad de este órgano varían en función de las diferentes especies del grupo aviar debido a su adaptación evolucionaria. Por ejemplo, en los pollos los ciegos (órgano doble en broilers) suponen entre el 1-6% del peso total del animal, valores muy inferiores a los que se dan en otras especies como el urogallo (Redig, 1989). Tanto el crecimiento como el desarrollo del animal dependen en gran medida de cómo se lleve a cabo la digestión y absorción de nutrientes e influyen directamente en la salud del animal. Así mismo, el intestino actúa como una barrera física a microorganismos patógenos y toxinas y tiene su papel central en la inmunidad innata y adquirida. De la integración de estas funciones en el GIT y de la regulación de las mismas dependen directamente tanto el estado sanitario como la productividad de las producciones animales (Mitchell y Moretó., 2006).

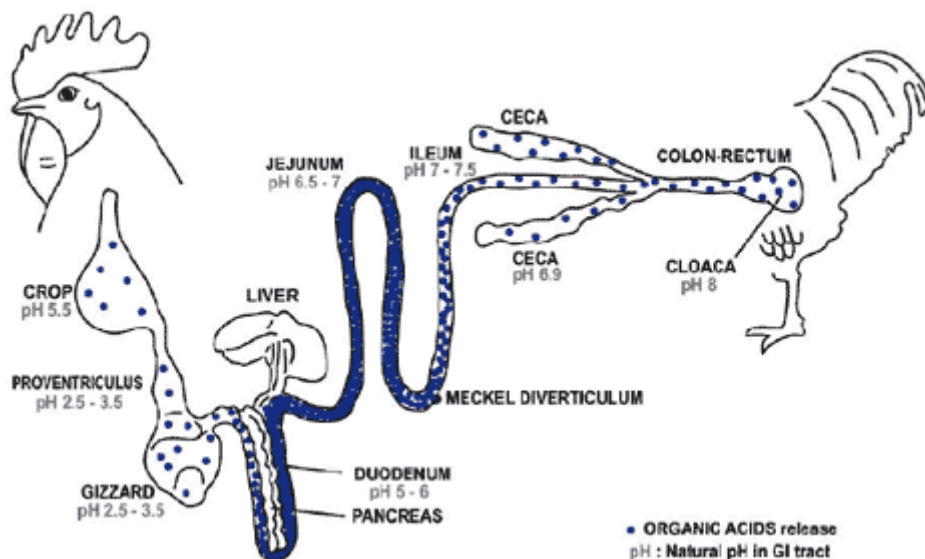


Figura 2.6. Tracto digestivo del pollo de engorde (Mitchell y Moretó, 2006)

2.4.2.1. Proceso de la digestión

Este proceso comienza en el pico, el cual permite al ave pre-procesar la comida, y desde el cual el bolo semi-triturado pasa al buche donde permanece unas seis horas antes de pasar al proventrículo (Grist, 2006). Allí tendrá lugar una fermentación bacteriana producida mayoritariamente por especies bacterianas del género *Lactobacillus* (Barnes y col., 1980; Mead, 1997). De ahí, el bolo alimenticio pasa al proventrículo y a la molleja, regiones independientes con funciones relacionadas. El proventrículo se encarga de secretar ácido disminuyendo el pH del contenido (Smith y Berrang, 2006) y la molleja actúa moliendo la comida digerida (Barnes, 1979). El bolo alimenticio pasa luego al intestino delgado. El siguiente paso consiste en la digestión por parte de sales biliares procedentes de la vesícula biliar y enzimas procedentes del páncreas. El intestino delgado con sus secreciones de moco y enzimas y su superficie de absorción a través de las microvellosidades hace el resto, convirtiéndose en el mejor sitio de digestión química y absorción de nutrientes. Tras esto, el producto de la digestión pasa al intestino grueso mediante la válvula ileocecal que desemboca en los dos ciegos (McLelland, 1989). La función del ciego consiste principalmente en proseguir la degradación de los compuestos menos digeribles y absorber el agua, la glucosa y los ácidos grasos volátiles, así como producir inmunoglobulinas y anticuerpos y participar en el metabolismo del ácido úrico en aminoácidos. En los pollos, el ciego tiene una motilidad activa que mezcla y periódicamente evacúa los contenidos del lumen. También se ha visto que las contracciones propias del ciego no parecen estar relacionadas con la motilidad ileal (Clench, 1999). Mientras el tiempo de tránsito en la región del intestino delgado es de sólo dos horas y media, el producto de la digestión puede permanecer en los ciegos de doce a veinte horas, permitiendo que la digestión y absorción de nutrientes se prolongue por un período de tiempo mayor (Sergeant, 2014). Tras la válvula ileocecal el bolo digerido pasa al colon, donde la absorción de nutrientes es mínima. Finalmente el bolo fecal se traslada a la cloaca, donde se mezcla con la orina procedente de los riñones y se expulsa (Clench y Mathias, 1995).

2.4.2.2. Factores relevantes que afectan al desarrollo del GIT en las aves

En pollitos (Obst y Diamond, 1992) y aves en general (Uni y col., 1999), la capacidad del intestino delgado aumenta en paralelo a la ingesta de nutrientes en la vida temprana tras el nacimiento. Uni y col. (1999) demostraron que tiene lugar un incremento progresivo tanto en el área de absorción como en la capacidad de la mucosa para hidrolizar nutrientes en las aves. Por tanto, todo esto sugiere que la ingesta alimentaria, el crecimiento intestinal y el desarrollo de las enzimas de la mucosa están controlados perfectamente para mantener el aporte de nutrientes de manera eficiente en el pollito tras su nacimiento.

Peso del pollo al nacer: el peso de los pollitos al nacimiento está directamente relacionado con parámetros como el peso o las dimensiones finales del intestino (Noy y col., 2001).

Dieta: se considera uno de los factores más importantes ya que el alimento sirve como estímulo para promover el crecimiento del GIT (Jiménez-Moreno y col., 2009). Por otra parte, Noy y Sklan (1998) han demostrado que el acceso temprano a la comida por parte de los pollitos recién nacidos da lugar a un desarrollo intestinal mucho más rápido en el período post-nacimiento, que inicia el crecimiento 24 horas tras ingestión.

Condiciones de crecimiento de los pollitos:

Temperatura: desde que los pollitos llegan a la granja hasta los primeros 14 días de vida, se puede considerar como el período más crítico en la vida del ave. Estos primeros días son cruciales porque el ave está cambiando de un sistema de regulación térmica inmaduro a un sistema maduro. Cometer un error en esta etapa puede ser crucial para la supervivencia del pollito y su posterior rendimiento productivo. El intervalo de temperatura de un pollo va desde los 37,5°C (al nacer) y los 41,5°C a los 15 días de edad. Es importante tener en cuenta que en temperaturas ambientales entre 20 y 28°C, el pollito no puede mantener su temperatura corporal, la cual irá disminuyendo progresivamente hasta alcanzar el límite letal inferior de 28°C (en los primeros días de vida). El límite letal superior empieza en 38°C, finalizando la vida del pollo a 47°C. Por eso, la temperatura es un factor sumamente importante en los pollitos tanto al inicio como en el desarrollo de su vida (Barroeta y col., 2011).

Otros: dentro de las variables ambientales, además de la temperatura, también son destacables la humedad relativa, la ventilación y la iluminación. Todas ellas pueden afectar el consumo voluntario del pollito y por ende, el crecimiento del GIT. El tipo de material de la cama como la viruta de madera, la cascarilla o la arena, son materiales estudiados y afectan directamente a la salud intestinal del animal. Otros como la densidad de las aves y el tipo de equipos también influyen en el crecimiento de este órgano y por tanto, en su producción (Uni y col., 1998).

2.4.2.3. Mucosa del GIT

El epitelio intestinal constituye la más importante y extensa barrera contra los agentes externos procedentes del entorno y tiene dos funciones críticas: por una parte, prevenir la entrada de microorganismos dañinos al interior del lumen, antígenos y toxinas; y por otra, permitir la translocación selectiva de nutrientes seleccionados y electrolitos a la circulación (Salminen e Isolauri, 2006; Salzman, 2011; Elson y Cong, 2012).

El GIT de los pollos experimenta una serie de cambios morfológicos y fisiológicos tras nacer, como el aumento del área de superficie para la digestión y la absorción que es un paso esencial para que estos animales puedan expresar su potencial genético para crecer (Nitsan y col., 1995). Por otra parte, el desarrollo intestinal está relacionado con la ingesta de nutrientes, la cual aumenta el diámetro intestinal y el peso relativo respecto al peso total del pollo (Gomide y col., 2004). La alta plasticidad de la mucosa intestinal es una característica especial que le permite responder a agentes exógenos, como los que están presentes en la comida o en situaciones patológicas. Las respuestas frente a estas situaciones pasan por cambios en la altura de las vellosidades intestinales (VH), profundidad de las criptas (CD), densidad de las vellosidades e índice de renovación epitelial (Gomide y col., 2004). Factores estresantes procedentes de la dieta tales como patógenos o micotoxinas pueden conllevar cambios bastante rápidos en la mucosa intestinal (Xu y col., 2003).

La morfología de la mucosa interna del intestino juega un papel fundamental en su función. En el proceso de renovación que se lleva a cabo continuamente en la mucosa intestinal, los enterocitos cobran especial importancia, ya que en su proliferación migran al lumen del intestino desde las criptas y favorecen la absorción intestinal mediante el

crecimiento del tejido intestinal, que con el tiempo dará lugar a la producción de nuevas células epiteliales (Uni y col., 1998).

La tasa de crecimiento de las vellosidades intestinales es diferente según las secciones del intestino. En el duodeno aumentan de volumen hasta el séptimo día y en yeyuno e íleon este crecimiento se produce hasta el día catorce (Uni y col., 1998). A pesar de que existen diferencias morfológicas en las vellosidades de pollos jóvenes entre los diferentes tramos del intestino, cuando alcanzan la edad adulta no se aprecian tales diferencias (Noy y Sklan., 1997). Con respecto a las criptas, se puede decir que tras el nacimiento del pollo incrementan rápidamente su tamaño y complejidad en el intestino y producen enterocitos bien diferenciados en duodeno y yeyuno hasta el día doce de edad. A mayor tamaño, mayor producción de enterocitos que luego se diferenciarán. La profundidad de las criptas aumenta con la edad y es mayor en duodeno que en íleon (Noy y Sklan., 1997; Uni y col., 1998). Las bacterias patógenas o sus toxinas dan lugar generalmente a un aumento en la tasa de renovación de las células epiteliales ya que provocan cierta descamación o inflamación de la mucosa (Yason y Schat, 1987). La relación entre la tasa de renovación y el consumo de energía y proteína para el mantenimiento del intestino es directamente proporcional, por lo que una colonización por parte de bacterias patógenas o sus productos de desecho darán lugar a la disminución de la eficiencia productiva del animal, entre otros aspectos (Xu y col., 2003).

2.5. Microbiota digestiva aviar. Flora habitual y flora patógena

2.5.1. Microbiota del GIT en broilers

Las bacterias son capaces de coexistir en cualquier hábitat y bajo condiciones muy diversas a las cuales se adaptan con bastante facilidad (Hugenholtz y Pace., 1996; Schlegel, 2004; Von Mering y col., 2007). Como ocurre en el caso de la anatomía del GIT, las aves han tenido que adaptar su microbiota en función de sus necesidades (Zoetendal, 2004). En el GIT de los animales y el hombre, además de bacterias, que son las mayoritarias, conviven levaduras, archeas, protozoos, hongos y bacteriófagos (Mackie, 2002). El ecosistema microbiano de animales y hombres está formado por más de 10^{14} UFC en total (Ercolini y col., 2001; Walter, 2008; Russell y col., 2011). La microbiota intestinal tiene una relación de simbiosis con el animal que habita, regulando multitud de procesos como la eficiencia de absorción de nutrientes, el tiempo de residencia en el GIT del bolo alimenticio, la utilización de nutrientes, la maduración intestinal o la modulación del sistema inmune (Amit-Romach y col., 2004; Oviedo-Rondón, 2009) (figura 2.7). Sin embargo, su función más importante consiste en crear una barrera defensiva frente a patógenos (Allen y Stanton, 2014; Rinttilä y Apajalahti, 2013; Forder y col., 2007; Rakoff- Nahoum y col., 2004). De acuerdo con Lunedo y col. (2014), existen dos lugares importantes donde habitan las bacterias intestinales con funciones diferenciadas: la mucosa y los contenidos del lumen. Las bacterias asociadas a la mucosa tienen una clara influencia sobre la estructura funcionalidad de la mucosa; las que habitan el contenido intervienen en la digestión de nutrientes e hidrólisis de compuestos y proporcionan nutrientes para la comunidad bacteriana propia y para el animal que la hospeda.

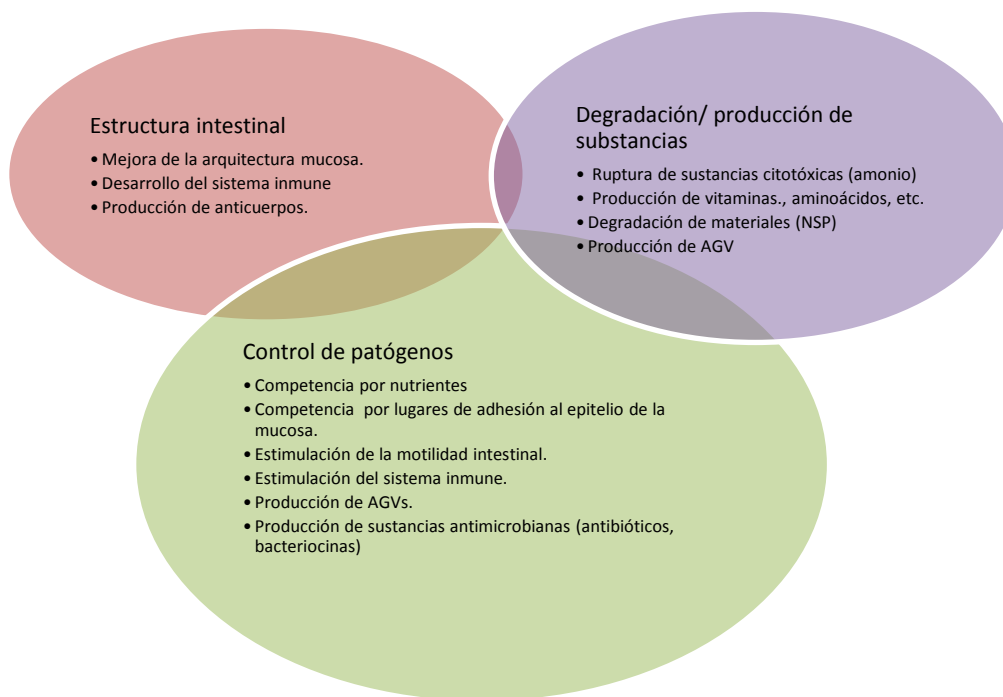


Figura 2.7. Mecanismos por los cuales la microbiota puede contribuir a la salud gastrointestinal de los animales y el hombre (Adaptado de Snel y col., 2002)

Estudios llevados a cabo hace algunos años mostraron que el GIT de las aves está colonizado por cerca de 640 especies bacterianas que pertenecen a 140 géneros diferentes (Apajalahti y col., 2004). Sin embargo, más recientemente se ha visto que el GIT de los pollitos de engorde abarca una microbiota que comprende 900 especies bacterianas diferentes (Wei y col., 2013). Las aves poseen una resistencia natural e inmunidad un tanto limitadas contra la colonización o infección desarrollada por microorganismos potencialmente patógenos (Ghosh y col., 2012). Por lo general hay bastante consenso en afirmar que el GIT de un pollo recién nacido es estéril y que la colonización empieza en cuanto el pollito tiene el primer contacto con los microbios del ambiente que le rodea. Por tanto, hay que tener en cuenta dicha influencia, la dieta que se le administre, considerada el principal determinante del perfil microbiano (Oviedo-Rondón, 2009), y el manejo y cuidado de las personas encargadas (Vahjen y col., 1998; Van der Wielen y col., 2002; Stanley y col., 2014). Se ha observado que los primeros colonizadores a nivel microbiano pertenecen por lo general a la familia *Enterobacteriaceae* seguidos de cerca por bacterias del género *Clostridium* y *Lactobacillus* claramente representativos (Zhu y col., 2002; Lu y col., 2003; Amit-Romach y col., 2004; Crhanova y col., 2011). La microbiota GIT se caracteriza por tener una población mayoritaria de bacterias acompañada por hongos y protozoos. Las especies bacterianas tienen preferencias variables respecto al substrato y a los requerimientos en cuanto a crecimiento se refiere. Se ha visto que la composición química del alimento digerido puede alterar la composición de la comunidad microbiana (Apajalahti, 2005). La diversidad es bastante significativa en las poblaciones bacterianas que se encuentran en los diferentes tramos del intestino y la densidad de la población microbiana tiene tendencia a aumentar desde la parte proximal a la parte distal del intestino (Apajalahti, 2005). También es importante destacar que cada región del intestino desarrolla su propio perfil microbiano y dicha comunidad se vuelve más compleja a

medida que los pollos van creciendo (Gong y col., 2002). La densidad bacteriana en el íleon de pollitos tipo broiler con un día de edad fue del orden de 10^8 UFC/g de contenido intestinal, mientras que para el ciego el número está más cerca de 10^{10} UFC/g. A partir del día tres de edad estos números aumentaban a 10^9 y 10^{11} UFC/g y así se mantenían estables durante los siguientes treinta días de vida del pollo (Apajalahti y col., 2004). Sin embargo, Scupham (2009) informó acerca de perfiles microbianos muy diferentes en el desarrollo de dos ensayos, y cambios en estos perfiles entre 4-11 semanas de edad. Incluso cuando el perfil microbiano es relativamente estable, especies microbianas de gran interés muestran de manera individual grandes fluctuaciones (Sekelja y col., 2012), sin que haya habido cambios notables en la dieta o las condiciones de crecimiento.

2.5.2. Flora habitual presente en el intestino de pollos broiler

De acuerdo con Lu y col. (2003), los grupos que predominan en la comunidad bacteriana intestinal del pollo son los pertenecientes al grupo de las Gram positivas alto GC (contenido de guanina y citosina) y bajo GC (filos Actinobacterias y Firmicutes, respectivamente), filo Proteobacterias y filo Bacteroides. Estudios recientes confirman este hecho (Wei y col., 2013) situando a los Firmicutes como el filo predominante en las secuencias bacterianas de pollos con un 70%, Bacteroides supone el 12,3 % y el tercer grupo corresponde, a las Proteobacterias con un 9,3%. El grupo de los Firmicutes, que está formado sobre todo por especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Streptococcus*, es el más abundante tanto en íleon como en ciego.

Composición microbiana del buche: de acuerdo con Sekelja y col. (2012), esta parte del intestino tiene una microbiota solapante que no puede ser diferenciada la una de la otra. La población mayoritaria es de la familia *Lactobacillaceae* (51.8%) género *Lactobacillus*, los cuales están unidos al epitelio por los componentes hidrocarbonados de la pared celular bacteriana. Esta asociación se produce justo después del nacimiento del pollito y perdura a lo largo de toda su vida, resistiendo a cambios en la dieta y métodos de crianza. También están presentes en cantidad substancial (aproximadamente un 10%) microorganismos de la familia *Clostridiaceae* (Fuller y Brooker, 1974; Sekelja y col., 2012; Peinado y col., 2013a; Choi y col., 2014).

Composición microbiana del íleon: las especies del género *Lactobacillus* son las más abundantes en este tramo del intestino (figura 2.8), en un 68,5 % del total, mientras que el 2,5% se corresponde con la familia de las *Proteobacteriaceae* entre las cuales se incluye *Escherichia coli*. Otras secuencias relacionadas con la familia *Clostridiaceae* representan el 9,7% del total. De los 7-21 días de edad las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* y *Enterococcus* son las dominantes. Para el resto de edades se aplica la generalidad de las especies dominantes del íleon (Lu y col., 2003). Recientemente se ha sabido que el íleon es una fuente de bacterias nuevas, especialmente productoras de butirato. Dado que la función de esta parte del intestino es la de absorber nutrientes, parece ser que un número considerable de estas bacterias desconocidas pueden influir en la biodisponibilidad de los nutrientes y en la tasa de absorción, mejorando de esta forma el rendimiento productivo de los broilers (Stanley y col., 2014).

Composición microbiana del ciego: el grupo más abundante en este tramo de intestino es el perteneciente a la familia *Clostridiaceae*, con aproximadamente un 60% (figura 2.9). Las bacterias pertenecientes al grupo de las Actinobacterias ocuparían un 13,9%, mientras que menos del 10% se corresponde a bacterias gram negativas, y de ellas el 2,8% a la familia *Proteobacteriaceae* y el 5,1% a la familia *Bacteroidaceae*. A los 3 d de edad del pollo, las proteobacterias se encuentran en un porcentaje de 15% mientras que *Lactobacillus* spp representan el 25% del total. Para el resto de edades, se aplica la generalidad de las especies dominantes del ciego. Dentro de la familia *Clostridiaceae*, los géneros *Clostridium*, *Eubacterium* y *Ruminococcus* dominan la comunidad bacteriana del ciego del pollo adulto (Lu y col., 2003). Estudios recientemente desarrollados (Wei y col., 2013), sugieren que el número de Firmicutes en este tramo intestinal ascendería a un 78% del total, mientras que los Bacteroides ocuparían un 11%.

A pesar de todo lo indicado en líneas anteriores, hay que tener en cuenta que un estudio de reconocido prestigio sugiere que el 10% de las bacterias intestinales presentes en los pollos son especies conocidas, mientras que 35% se desconocen pero podrían relacionarse con un género conocido y el restante porcentaje (55%) es completamente desconocido (Apajalahti, 2004). Por otro lado, Van der Wielen y col. (2002) demostraron que la diversidad de la microbiota intestinal aumenta con la edad, especialmente en los ciegos. Dentro de un mismo grupo, diferentes individuos pueden presentar comunidades microbianas muy diferentes, y animales de la misma edad y raza pueden tener poblaciones microbianas únicas.

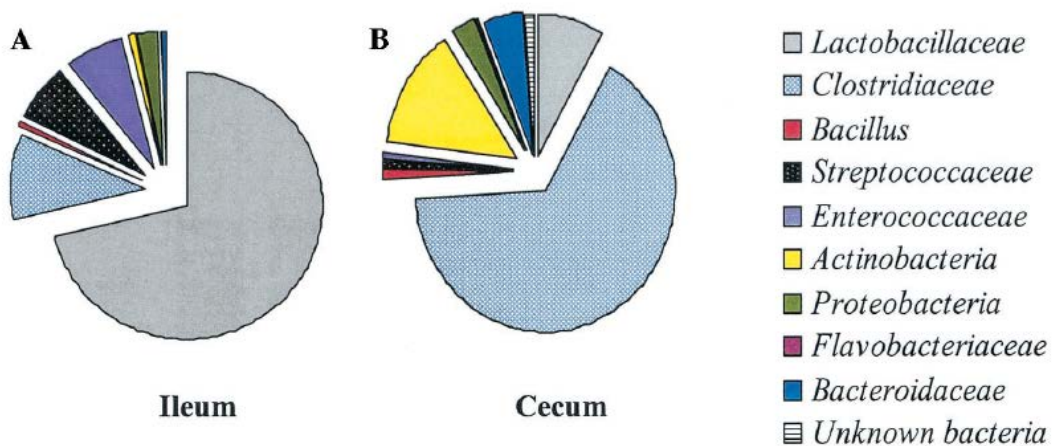


Figura 2.8. Composición de la microbiota de ileon y ciego de pollos broiler determinada por la secuenciación de 1230 clones del 16S ribosómico procedente de una colección de DNA. A, composición bacteriana del íleon. B, composición bacteriana del ciego (Lu y col., 2003)

2.5.3. Flora patógena presente en el intestino de pollos broiler. Implicaciones sanitarias

El GIT posee una serie de mecanismos que le permiten protegerse de agentes procedentes de la dieta que pueden provocarle ciertas enfermedades. Es difícil establecer las causas por las cuales se produce una enfermedad entérica, y además perturbaciones de tipo físico, químico o biológico que se produzcan en la digestión y absorción de nutrientes pueden desembocar en una enfermedad gastrointestinal (Dekich, 1998). El riesgo de contaminación desde el pollo hasta el consumidor humano está presente en todas las etapas, desde la

manipulación de las aves vivas pasando por el sacrificio, la elaboración, almacenamiento, manipulación y preparación de las aves de corral, ya que pueden estar contaminadas con agentes infecciosos nocivos. Los productos avícolas no cocinados causan al año un número muy significativo de casos de intoxicación alimentaria en los seres humanos (CDC, 2000; CDC, 2001). La manipulación y el consumo humano de los productos avícolas llevan a que dichos productos sean un importante vehículo de patógenos bacterianos que afectan al hombre, dando lugar a enfermedades debidas a la contaminación de los productos avícolas (toxoinfecciones alimentarias) (Northcutt y col., 2003). Para poder cuantificar los riesgos de intoxicación alimentaria a lo largo de la cadena de producción y comercialización, es importante conocer de qué forma y cuándo tiene lugar la contaminación por microorganismos, y en función de esto aplicar controles para reducir los riesgos. Estos controles se basan fundamentalmente en la mejora de la tecnología y la aplicación de medidas de higiene muy estrictas y controladas. En este sentido, es vital refrigerar la carne y canales de ave una vez sacrificadas reduciendo de esta forma el riesgo de multiplicación de patógenos.

La microbiota de las aves vivas se mantiene en gran parte tras el sacrificio del animal y puede dar lugar a la contaminación en los lugares donde se procesa la carne. Es el caso de las bacterias de los géneros *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp, las cuales habitan el GIT de las aves sanas y pueden causar enfermedades en los seres humanos, dependiendo de su patogenicidad y del número y concentración de bacterias en el producto. Cuanto más limpias lleguen las aves al lugar del sacrificio, menor será el número de bacterias presentes en sus canales durante el mismo (FAO, 2013a). Existe una evidencia bastante clara de que las aves de corral pueden ser la principal causa de campilobacteriosis en humanos (Van Vliet y Ketley, 2001; Hermans, 2012; Line, 2013) y durante las últimas tres décadas, el género *Campylobacter* ha supuesto una gran preocupación en este sentido (Vandeplas y col., 2008). Determinados estudios epidemiológicos indican que del 50 al 70% de campilobacteriosis en humanos se debe al consumo de productos avícolas (Harris, 1986; Keener, 2004). Esta bacteria se encuentra habitualmente como comensal en el tracto digestivo de los broilers (Ansari-Lari, 2011; Peinado y col., 2012). La especie más importante dentro de este género bacteriano es *C. jejuni*, la cual coloniza la mucosa de las células epiteliales en ciego e intestino delgado en broilers (Vandeplas y col., 2008) pudiendo dar lugar a una reducción en la ganancia de peso del pollo (Morishita y col., 1997).

Junto con el género *Campylobacter*, hay que mencionar a *Salmonella*, un género bacteriano que está presente en la carne y huevo de pollos y que es capaz de contaminar la carne que se destina a consumo humano durante la conservación de la misma a bajas temperaturas produciendo de esta manera enfermedades de etiología entérica en humanos. La enfermedad en humanos puede venir del manejo de la carne cruda o de cocinar de manera inadecuada el producto final. *Salmonella* y *Campylobacter* son los organismos microbianos que más preocupan en este sentido a nivel mundial (Mead y col., 2004). En humanos la salmonelosis afecta habitualmente tan sólo al sistema digestivo, pero si se complica puede dar lugar a enfermedades fuera de este órgano comprometiendo la salud en personas inmunodeprimidas, de edad avanzada o en edad escolar (Fernandes y col., 2003). La carne como alimento y en especial la que procede de las aves y más concretamente de los pollos es la fuente más común de enfermedades alimentarias causadas por *Salmonella* spp (Mead y col., 2004). Finalmente, el aumento mundial en el consumo de productos avícolas conlleva un

mayor riesgo de que la manipulación de estos productos pueda constituir un importante foco y/o vehículo de patógenos bacterianos que afectan al hombre, dando lugar a determinadas toxiinfecciones alimentarias (listeriosis, salmonelosis) (Northcutt y col., 2003).

Especial atención merece la enteritis necrótica, enfermedad causada por *Clostridium perfringens*, infección económica y clínicamente muy importante, que afecta principalmente a los pollos de tipo broiler y que se desarrolla sobre todo en pollos de hasta doce semanas de edad (Quinn y col., 2002; Hafez, 2011). Este patógeno es parte de la flora normal de las aves (Lu y col., 2003), pero bajo condiciones determinadas da lugar a necrosis de la mucosa intestinal y la lesión que se asocia a la enteritis necrótica (Al-Sheikhly y Truscott, 1977). Además, *C. perfringens* puede dar lugar a infecciones bacterianas secundarias, lo que se traduce en una disminución muy considerable de todos los índices productivos (Collier y col., 2008). Se ha observado que se acarrean pérdidas en producción debidas a una disminución del rendimiento en los pollos afectados por este tipo de enfermedad, cuya incidencia ha aumentado considerablemente tras la prohibición de los AGP (Hafez, 2011). La enfermedad es una toxo-infección entérica caracterizada por decaimiento, disminución del apetito, disminución del movimiento, diarrea y alta mortalidad (Mitsch y col., 2004). En humanos causa gastroenteritis severas ya que es capaz de multiplicarse mucho más rápido que la mayoría del resto de bacterias, tiene potencial suficiente como para alcanzar niveles patogénicos en comida contaminada y no refrigerada lo que provoca que los consumidores ingieran grandes cantidades del patógeno (FDA, 2012). Es una de las enfermedades de etiología alimentaria más comunes en USA de acuerdo a Scallan y col. (2011) registrándose 965.958 casos al año. Mientras que en la UE el 14,6% de las enfermedades de este tipo es producida por la toxina de *C. perfringens* (EFSA y ECDC, 2013)

Otro desorden importante que afecta al GIT de los pollitos es la coccidiosis, enfermedad de tipo entérico con el suficiente potencial como para causar un daño económico severo en la producción de broilers. Los gastos ocasionados en la industria avícola a nivel mundial ascienden a tres billones de dólares anuales. Las especies del género *Eimeria* se multiplican en el GIT, causando daño celular y problemas en la absorción de nutrientes y pérdida de sangre, además de causar diarrea, deshidratación y una alta mortalidad (Persia y col., 2006). Estos protozoos están presentes en el medio de cría de los pollitos, por lo que es muy difícil controlar su proliferación mediante la cuarentena o la desinfección del medio (Abdelrahman y col., 2014). Esta patología facilita que otras bacterias potencialmente patógenas o patógenas, como el *Clostridium perfringens*, se establezcan y multipliquen en el intestino.

L. monocytogenes es un problema grave asociado a productos procesados de carne de ave (Keklik, 2010). La listeriosis es una importante enfermedad causada por esta bacteria y un gran problema para la salud pública debido a las graves consecuencias como: meningitis o meningoencefalitis, septicemia y aborto (Melero, 2013). La carne de pollo cruda, o mal cocinada, es la principal fuente de infección en humanos. Algunos estudios han mostrado porcentajes muy elevados de *L. monocytogenes* en carne cruda en los países de la UE como España (6.1%), Portugal (60%), Turquía (11,5%) e Italia (21,6%) (Goh, 2012). Más recientemente Scallan y col. (2011) han informado de que esta enfermedad se registra en

aproximadamente 1,591 casos anuales en USA. En el año 2013 se registraron en la UE 1800 casos (EFSA y ECDC, 2015)

E. coli de tipo enterohemorrágico ((EHEC) O157:H7), provoca una enfermedad con síntomas muy graves como diarrea con sangre, debido a que en su colonización esta bacteria produce una hemorragia en el intestino. Como problema añadido se ha comprobado que *E. coli* posee un extenso espectro de resistencia a los antibióticos, lo cual representa un gran riesgo a la inocuidad alimentaria y una amenaza para la salud pública (Forgetta, 2012). De acuerdo con Scallan y col. (2011) anualmente se detectan en USA alrededor de 63,000 casos de infección por este patógeno.

La EFSA (European Food Safety Authority) y el ECDC (European Centre for Disease Prevention) emitieron un informe en este sentido sobre zoonosis y brotes de etiología alimentaria en el que se explica cómo se ha dado un aumento en los últimos años de infecciones en humanos causadas por *Campylobacter* spp y *E. coli*, mientras que los casos de salmonelosis cayeron en el año 2011 y siguen con esta tendencia. Más de 200.000 casos de enfermedades causadas por *Campylobacter* spp fueron detectadas en Europa en el año 2013 (EFSA y ECDC, 2015) y se espera que el número aumente en los próximos veinte años debido a un aumento en el consumo de la carne de pollo, principal transmisora de esta enfermedad (Aho, 2012). En USA este número asciende hasta los 845.024 casos (Scallan y col., 2011). En humanos, no sólo causa gastroenteritis (OMS, 2005) sino también infecciones extraintestinales especialmente en personas con inmunodepresión (De Vries y col., 2008). Por lo que respecta a infecciones causadas por *Salmonella*, en 2011 se detectaron 1.027.561 casos en USA (Scallan y col., 2011) y en la UE alrededor de 95.000, que disminuyeron en el año 2013 hasta alrededor de los 83.000 casos, lo que demuestra su disminución frente a los datos de años anteriores (EFSA y ECDC, 2015). En este sentido, la Unión realiza un gran esfuerzo para erradicar dichas infecciones mediante los programas de control de *Salmonella* (EU) establecidos por los Estados Miembros y controlados por la Comisión Europea. En 2011, en la Unión Europea se registraron 5.648 brotes de etiología alimentaria (EFSA y ECDC, 2013). En la figura 2.9. se recoge el número de casos de campilobacteriosis y salmonelosis humana en España en el intervalo de los años 2005-2011.

En las últimas décadas, la globalización de la producción y comercialización de los pollos ha llevado a que el riesgo de contaminación de los productos por bacterias pueda darse en cualquier lugar. Por otro lado, cada vez menos productos avícolas contaminados llegan al mercado gracias a herramientas de diagnóstico más rápidas y fiables, al establecimiento de un sistema de alerta epidemiológica mundial y a la mejora general de las normas de higiene. Dado que la mayoría de las amenazas para la inocuidad alimentaria relacionados con las aves de corral derivan de riesgos inmediatos relacionados con la ingestión de alimentos contaminados con bacterias zoonóticas, las labores de reglamentación y los ensayos se han centrado en reducir la incidencia de este tipo de contaminación, prestando especial atención a la cadena alimentaria. En la reducción de estos riesgos han de implicarse las personas que se dedican a preparar el pienso, los agricultores, los cuidadores de los pollos, quienes los comercializan, los restaurantes, las autoridades sanitarias y los consumidores (Senior, 2009).

La OMS ha establecido el Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG), que armoniza los esfuerzos internacionales para calcular y reducir la incidencia mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria. Esto ayudará a los países a calcular la magnitud de estas enfermedades y a evaluar los avances realizados para su control (FAO/OMS, 2013). Además el reglamento (EC No 2160/2003) vela por la seguridad de los consumidores en este mismo sentido.

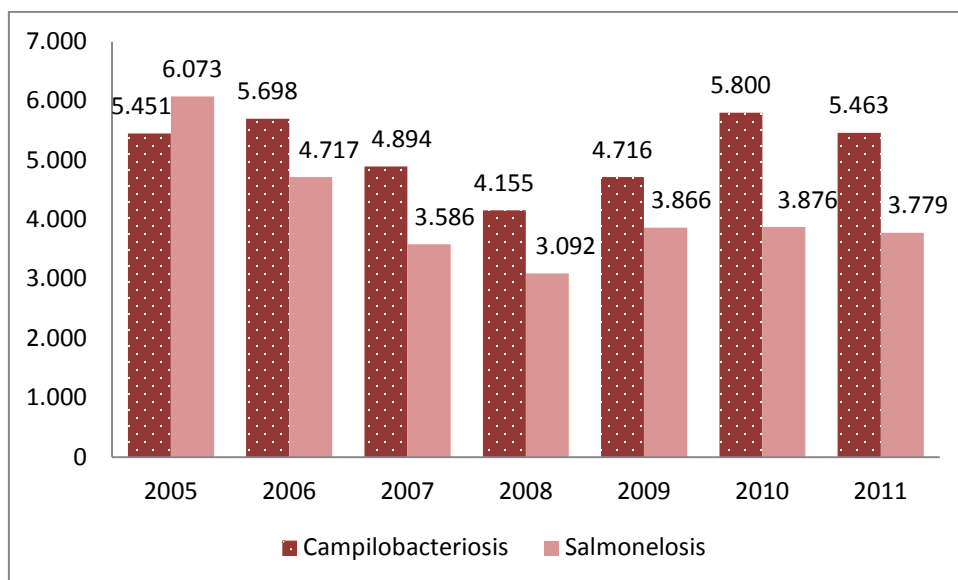


Figura 2.9. Número de casos de campilobacteriosis y salmonelosis humana en España en el intervalo de los años 2005-2011 (OIE, 2013)

2.5.4. Principios de higiene de la carne que se aplican a la producción primaria (FAO/OMS, 2009)

1. La producción primaria deberá gestionarse de manera que reduzca la probabilidad de introducción de peligros y contribuya en forma apropiada a que la carne sea inocua y apta para el consumo humano.
2. El sector de la industria primaria y la autoridad competente deberán establecer, siempre que sea posible y viable, sistemas para recopilar, cotejar y facilitar información sobre los peligros y condiciones que puedan estar presentes en las poblaciones animales y que puedan afectar a la inocuidad y salubridad de la carne.
3. La producción primaria deberá incluir programas oficiales u oficialmente reconocidos para el control y la vigilancia de los agentes zoonóticos presentes en las poblaciones animales y en el medio ambiente según corresponda a las circunstancias, y se deberá dar parte de las enfermedades zoonóticas de declaración obligatoria, según se requiera.
4. Unas buenas prácticas de higiene (BPH) en la producción primaria deberán incluir, por ejemplo, la salud e higiene de los animales, registros de los tratamientos, piensos e ingredientes de los piensos y factores ambientales pertinentes, así como la aplicación de los principios de HACCP (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos), en la mayor medida posible.

5. Las prácticas de identificación de los animales deberán permitir la rastreabilidad hasta el lugar de origen, en la medida de lo posible, para poder llevar a cabo una investigación reglamentaria en caso necesario.

2.6. Técnicas para evaluar y/o cuantificar la microbiota gastrointestinal

2.6.1. Cultivos microbianos

Es la forma tradicional de análisis y cuantificación de la flora microbiana, y por sus propias condiciones tan sólo una fracción de la microbiota (aquella cuyos requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo se conocen) queda recogida. Sin embargo, en el caso de las poblaciones minoritarias como los patógenos, pueden ser de gran utilidad ya que emplean condiciones muy selectivas. Si se usan e interpretan correctamente pueden llegar a detectar poblaciones microbianas en concentraciones muy bajas. Este tipo de técnica no es capaz de evaluar el total de la comunidad microbiana en hábitats de tipo anaeróbico y con cierta complejidad como es el caso de las aves, aunque el costo es indudablemente menor que en las otras técnicas que se manejan. Por tanto, en algunos casos siguen utilizándose en la actualidad (Apajalahti y Kettunen, 2006). Este método tiene el inconveniente de ser laborioso, lento a la hora de proporcionar resultados y además limita el número de muestras que puede ser procesado (Leser y col., 2002).

2.6.2. Microscopía de fluorescencia

Las bacterias suficientemente grandes pueden observarse por microscopía de fluorescencia, pero sólo algunas de ellas pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio, debido a las complicadas necesidades que exigen este tipo de bacterias. Menos del 10% de las bacterias intestinales pueden ser cultivadas de esta forma. Los estudios realizados hasta la fecha sólo pueden demostrar cambios en grupos bacterianos minoritarios tales como los patógenos (Apajalahti y col., 2002).

2.6.3. Métodos moleculares

Desde hace varias décadas el interés por determinar este tipo de microbiota se ha hecho cada vez más patente. Los métodos de cultivo y aislamiento no han resultado suficientemente útiles para tal fin debido en gran parte a las dificultades con las bacterias anaerobias o anaerobias facultativas, ya que la mayoría son difíciles de aislar y mantener (Mead, 1997). Por otro lado, el desarrollo de las técnicas moleculares que se ha producido recientemente ha permitido que se detecten de manera rápida y específica un amplio rango de bacterias. Durante muchos años, la determinación de las relaciones filogenéticas existentes entre bacterias se ha realizado mediante la secuenciación del RNA ribosómico 16S, empleándose también en detección e identificación bacteriana en laboratorios clínicos. Este método además también es efectivo para detectar bacterias que de otra manera no podrían diferenciarse mediante los métodos convencionales (Patel, 2001). Además, esta metodología ha sido empleada de manera satisfactoria para determinar variaciones en poblaciones bacterianas en intestino delgado y ciego de pollos (Gong y col., 2002; Zhu y col., 2002; Amit-Romach y col., 2004), la aplicación de la técnica de PCR basada en el gen que codifica el 16S

rRNA es válida para determinar cambios en la microbiota del intestino delgado y ciego de pollos en edad adulta y también para monitorizar la presencia de bacterias potencialmente peligrosas.

Una de las aplicaciones más relevantes de esta metodología es la de la cuantificación bacteriana en muestras de alta carga microbiana en las cuales se encuentran mezclas muy complejas de DNA, ya que esta técnica es capaz de distinguir en ellas secuencias específicas (Valasek y Repa, 2005). En un estudio realizado por Wise y Siragusa (2007), se comprobó la eficacia de dicha metodología cuantificando la abundancia de secuencias de DNA ribosómico 16S en poblaciones bacterianas intestinales de muestras tomadas de íleon y ciego de pollos. Estudios posteriores (Guardia y col., 2011; Tillman y col., 2011) corroboraron dicha utilidad mediante la cuantificación de determinadas especies microbianas presentes en muestras frescas del buche, ciego e íleon de broilers. En este mismo sentido, pero enfatizando la cuantificación de especies consideradas potencialmente patógenas en el GIT de pollos, tales como *Escherichia coli* o *Clostridium perfringens*, Kim y col. (2011) llevaron a cabo un experimento utilizando técnicas moleculares con resultados satisfactorios demostrando que son técnicas más rápidas y precisas para detectar cambios en la diversidad microbiana en intestino aviar, sobre todo cuando se trata de ensayos de alimentación seriados en el tiempo. Wang y col. (2013), identifican perfectamente mediante esta técnica las especies predominantes de *Lactobacillus* en el GIT de pollos en todos sus tramos, desde el buche hasta el recto.

Para comprender como se desarrollan los diferentes métodos moleculares es importante conocer previamente cierta terminología básica:

Amplificación de DNA: este proceso consiste básicamente en replicar una y otra vez un mismo fragmento de DNA. Mediante esta técnica se amplifica un gen o fragmento de DNA, es decir, se producen un gran número de copias. Para realizar este procedimiento se debe de conocer la secuencia del fragmento a amplificar. También puede realizarse una amplificación de RNA utilizando un DNA complementario de RNA. Para este proceso se necesita la acción de la enzima transcriptasa inversa (polimerasa) y de un par de oligonucleótidos, sintetizados de manera artificial, utilizados como cebadores (primers) que definen la secuencia de DNA de doble cadena que se quiere amplificar. Estos tienen secuencias complementarias (pares de bases) cada uno de ellos a una de las dos cadenas del DNA. Con las técnicas de amplificación conseguimos hacer billones de copias de una secuencia corta de un gen concreto en poco tiempo (Saiki y col., 1985; Newton y Graham, 1997).

Hibridación del DNA: se basa en la construcción de ácidos nucleicos de doble cadena a partir de dos ácidos nucleicos de una sola cadena debido a la complementariedad de bases. Se trata de la unión de dos cadenas de DNA, RNA o de DNA y RNA complementarias entre sí, con el objetivo de formar una molécula de ácido nucleico de doble cadena. Este método permite estudiar en qué grado se relacionan genéticamente dos ácidos nucleicos (Watson y col., 1988).

Transfección del DNA: consiste en la introducción de material genético de origen exógeno a células en cultivo. Mediante esta técnica se puede alterar el genoma de una célula de manera estable para que produzca una proteína recombinante o evaluar la robustez de un promotor

acoplado a un reportero (un gen que se liga a una secuencia regulatoria de otro gen presente en una bacteria y que es de interés para el ensayo) (Castro y Portelles, 1997).

Enzimas de restricción: se conocen como endonucleasas de restricción, se encargan de hidrolizar moléculas de DNA mediante la ruptura de los enlaces fosfodiéster internos de las mismas. Estas enzimas son las responsables en bacterias del fenómeno conocido como modificación de restricción controlada por el hospedador, o modificación fenotípica (Puerta y Ureña, 2005).

Secuenciación de DNA: está basada en un procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de alta resolución (llamado gel de secuenciación), el cual es capaz de resolver cadenas sencillas de oligonucleótidos con longitudes entre 300-1000 bases que difieren de tamaño por solamente un deoxinucleótido. Para determinar la secuencia de una región concreta de DNA, se producen en cuatro reacciones químicas o enzimáticas aisladas, un grupo de oligonucleótidos marcados de cadena sencilla que empiezan en el mismo extremo fijo, y difieren en longitud unos de otros por tan sólo una base sucesiva en la secuencia. De este modo, la primera de las reacciones generadas posee todos los oligonucleótidos de distinta longitud que terminan en el deoxinucleótido G, la segunda a los que terminan en A, la tercera en T y la cuarta en C. Los deoxinucleótidos originados en las cuatro reacciones se solventan bajo condiciones desnaturalizantes en carriles contiguos de un gel de secuenciación (Zabala Castro, 2005). Es de gran importancia conocer las secuencias ya que gracias a ello se ha podido desarrollar el Proyecto del Genoma Humano y otros proyectos relacionados como establecer la secuencia completa de DNA de muchos genomas de animales, plantas y microorganismos (entre ellos el del pollo), para intervenir en el mismo y mejorar aspectos tales como la salud y la producción agraria y ganadera, ya que modificando el genoma pueden prevenirse y tratarse multitud de enfermedades humanas y animales (Stanley y col., 2014; Irfan-Maqsood, 2015).

Todos los métodos moleculares están basados en el estudio de diversos genes, sobre todo, en el caso de bacterias, los genes que codifican el RNA ribonucleico 16S. Los principales son:

2.6.3.1. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH): para la FISH se utilizan *sondas* de DNA de unos 20-28 nucleótidos complementarias de regiones específicas de los RNA ribosómicos 16S y marcadas con fluorocromos. Para llevarla a cabo se desnaturaliza el DNA con calor y se le añade a la muestra una fracción de DNA marcada con fluorescencia (sonda). El primer paso consiste en la hibridación de las sondas a los fragmentos específicos del DNA muestra y el segundo en teñir con un tampón con color. Finalmente la muestra se ve a través de un microscopio de fluorescencia. Esto nos permite poner de manifiesto alteraciones cromosómicas e identificar grupos bacterianos a partir de determinadas secuencias conocidas (Leverslha, 1993; Blasco y col., 2003).

2.6.3.2. Hibridación dot-blot con sondas diana para RNA ribosómico: dentro de las técnicas de hibridación tiene la ventaja de que no se requiere ruptura previa del DNA ni electroforesis y además permite el ensayo rápido de multitud de fragmentos clonados por su homología con una sonda radioactiva. En la posterior incubación con sondas de DNA complementarias a las secuencias de DNA que buscamos (conteniendo las mutaciones o secuencias que buscamos),

cada muestra se coloca en un punto determinado llamado “dot” y después se desnaturaliza para que la hibridación pueda tener lugar (Sambrook y col., 1989).

2.6.3.3. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE): es un tipo de electroforesis que consiste en la disociación de fragmentos de DNA del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello se incorpora un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes del DNA a lo largo de un gel de poliacrilamida a concentración que resulta desnaturalizante separando así las cadenas según la secuencia de nucleótidos, es decir, el contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina. Así fragmentos de DNA con secuencias nucleotídicas diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel. Lo que facilita su separación y posterior secuenciación e identificación de un determinado grupo bacteriano (Myers y col., 1987).

2.6.3.4. Electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE): técnica basada en la separación electroforética de fragmentos de DNA, los cuales poseen secuencias específicas de igual longitud y son separados en una matriz de poliacrilamida que contiene un gradiente de temperatura que se crea a lo largo de la longitud del gel. Conforme la temperatura se incrementa, las hebras de DNA empiezan a separarse (proceso conocido como melting) y empieza a disminuir la velocidad con la que se mueven a través del gel, la temperatura exacta a la que se da este proceso depende de la secuencia (pares de bases), por tanto, este método no sólo sirve para separar moléculas sino también para aportar información adicional sobre el comportamiento y estabilidad de la secuencias a identificar dentro de un determinado grupo bacteriano (Muyzer, 1999; Huys y col., 2008).

2.6.3.5. Secuenciación de DNA ribosómico: consiste en el marcaje *in vivo* y purificación del 16S rDNA y su posterior tratamiento con la enzima ribonucleasa T1, una enzima de restricción que se encarga de la ruptura de los enlaces fosfodiéster que se encuentran en el DNA ribosómico. Tras esto se separan los fragmentos generados y se determina la secuencia de todos aquellos que incluyan al menos seis nucleótidos. Seguidamente, se alinean y comparan las secuencias de la colección de fragmentos que corresponden a distintas bacterias por medio de determinados programas informáticos y partir de esos datos se puede elaborar un árbol filogenético, que expone de manera precisa el nivel de relación genética entre las especies bacterianas a comparar (Rodicio y Mendoza, 2004)

2.6.3.6. Terminal Restriction Fragment Leght Polymorfism (TRFLP): consiste en la amplificación de segmentos característicos de bacterias o grupos de bacterias por PCR (polymerase chain reaction) (ver abajo), utilizando “primers” (cebadores) universales marcados con fluorescencia. Tras esto, se produce una digestión mediante una o varias enzimas de restricción y los fragmentos de restricción se separan realizando un gel de poliacrilamida o capilar electroforético. Los fragmentos de restricción terminales (T-RFs) se detectan por un secuenciador de DNA y se estiman las longitudes de los mismos por medio de patrones. El resultado de la huella dactilar del T-RFLP de una comunidad es un conjunto de T-RFs que se refieren al perfil de un único fragmento. La longitud de un fragmento depende de la posición de los lugares de reconocimiento de la enzima de restricción en cuestión y las diferentes longitudes del T-RF representando secuencias genéticas diferentes. Estas

secuencias corresponden a grupos bacterianos concretos. Esta técnica permite obtener un perfil más completo de los microorganismos presentes en las muestras y es una de las más utilizadas para estudiar la diversidad microbiana en general en el GIT. Su principal inconveniente es que no diferencia los microorganismos por grupos taxonómicos, aunque la restricción enzimática teórica permitiría solventar dicho problema, tal y como se indica en Cole y Chai (2003).

Todos estos métodos se han utilizado para el estudio de la microbiota intestinal y aunque proporcionan información bastante válida de la comunidad microbiana intestinal no son las técnicas actualmente consideradas óptimas para una evaluación cuantitativa ya que carecen de la sensibilidad necesaria y se emplean más bien para estudios poblacionales (Rinttilä y col., 2004).

2.6.4. PCR (polymerase chain reaction) y PCR a tiempo real (RT-PCR)

Esta es la técnica principalmente utilizada en esta tesis, por lo que haremos una descripción algo más detallada. Es la principal técnica de cuantificación/identificación bacteriana. La técnica de PCR está basada en el mecanismo de la replicación *in vivo* del DNA: el DNA bicatenario se desenrolla y pasa a DNA monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. La duplicación se lleva a cabo mediante la síntesis de una copia idéntica al DNA que se pretende replicar. De esta manera de una molécula de DNA única, se obtienen dos o más "clones" de la primera.

En el laboratorio, esta técnica consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización del DNA por fusión a temperatura elevada con la finalidad de convertir el DNA bicatenario en DNA monocatenario (desenrollamiento), tras lo que se produce la unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos (cebadores) al DNA diana y por último la extensión de la cadena de DNA por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando DNA polimerasa en presencia de iones Mg^{2+} (Sambrook y col., 1989).

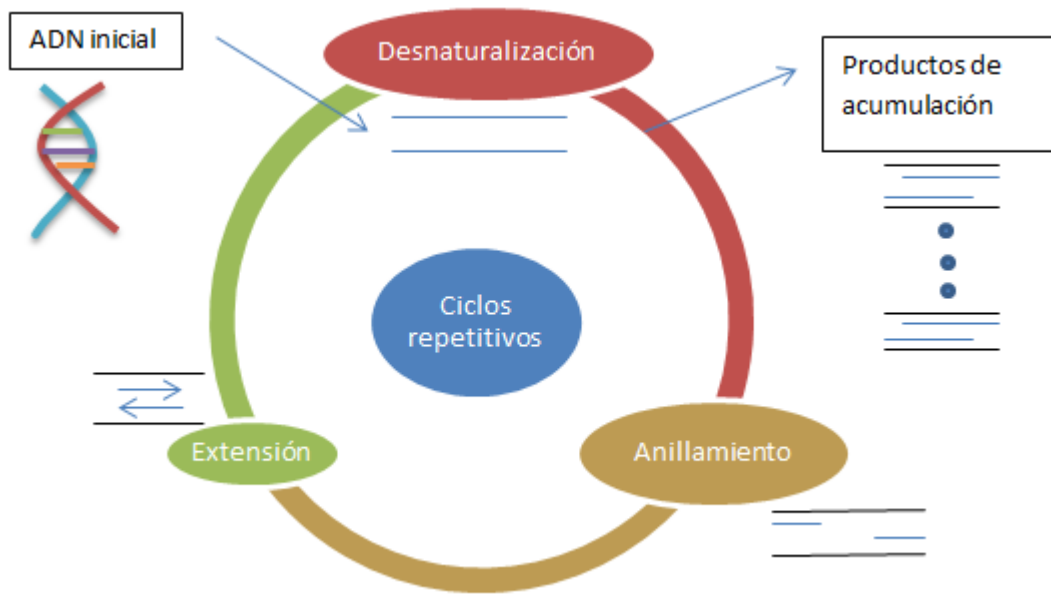


Figura 2.10. Fases que tienen lugar en el ciclo de PCR (Adaptado de Kennedy y Oswald, 2011)

La RT-PCR es una variante de la PCR que se utiliza para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación (amplicón). Constituye un gran avance con respecto a la básica PCR y ha resultado tener mucho éxito cuando se usa para la cuantificación de DNA bacteriano en diversos entornos tales como heces (Requena y col., 2002; Bélanger y col., 2003; Malinen y col., 2003), tejido colónico (Fujita y col., 2002), rumen (Tajima y col., 2001) y tejido gástrico (He y col., 2002). De acuerdo con Rinttilä y col. (2004), esta metodología es mucho mejor que las hasta ahora empleadas cuando se trata de la detección y cuantificación de especies bacterianas aisladas o grupos bacterianos mayores cuya procedencia son las heces.

El término RT-PCR se refiere a la detección por fluorescencia de las cadenas que se forman en el proceso de amplificación del DNA por utilización de un fluorocromo que emite fluorescencia sólo tras unirse al DNA de cadena doble. El termociclador, que es un equipo capaz de analizar y detectar la fluorescencia, se encarga de monitorizar ciclo a ciclo el aumento exponencial (figura 2.10) en el número de cadenas de DNA. El gran beneficio analítico consiste en que permite al investigador determinar mejor la cantidad de DNA inicial en la muestra (Valasek y Repa, 2005).

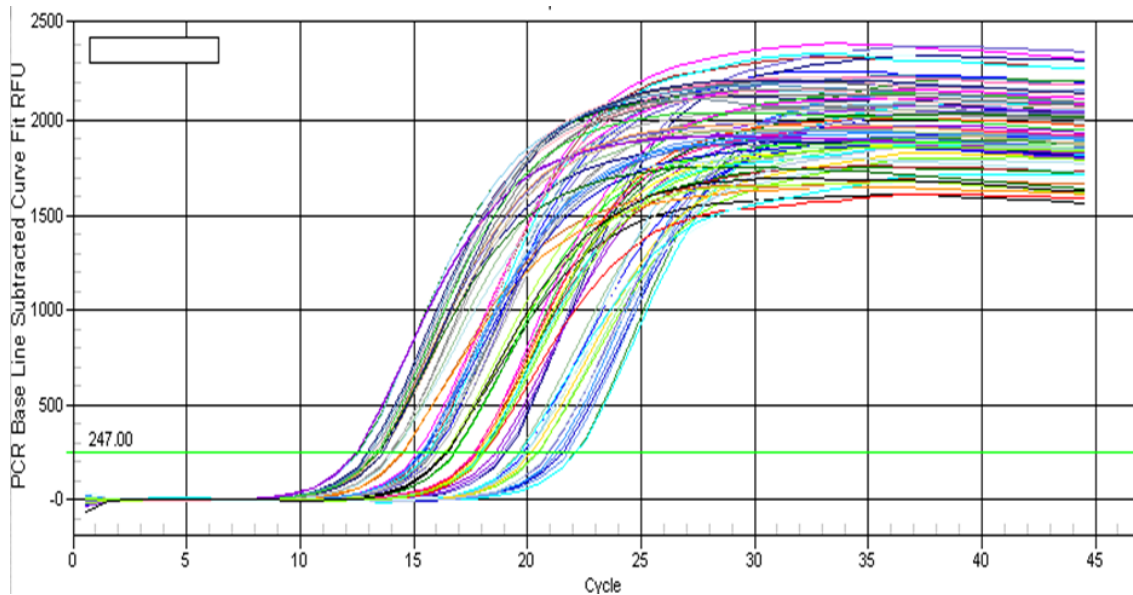


Figura 2.11. Ejemplo de las curvas de amplificación de patrones y muestras de contenido cecal de pollos en RT-PCR

Esta técnica que se emplea principalmente para cuantificar copias de genes diana en el DNA de muestras que son directamente extraídas del lugar donde se encuentran originariamente. Se suceden habitualmente una serie de ciclos (entre 30 y 40) de amplificación a diferentes temperaturas donde el DNA se desnaturaliza a 95°C. Se usa una colección de “primers” o cebadores específicos de cada grupo bacteriano a cuantificar. Estos son cadenas cortas de oligonucleótidos que han sido diseñadas para ser complementarias a algún fragmento de la secuencia del gen concreto que se quiere estudiar. El DNA se extiende para generar una hebra complementaria gracias a la acción de una polimerasa termoestable. Estas hebras ofrecerán el molde en el siguiente ciclo de amplificación y así sucesivamente (Biorad, 2006). Los cebadores específicos garantizan la cuantificación de la abundancia de un marcador genético para un grupo definido en la comunidad bacteriana, el cual puede ser determinado por comparación con una curva estándar de ese mismo grupo (Wise y Siragusa, 2007). El resultado de este proceso es un aumento exponencial, donde al final de la reacción se obtienen 2^n copias (donde n es el número de ciclos) de los productos de amplificación, cuya cantidad puede ser monitorizada en cada ciclo gracias a la utilización de la sonda fluorescente. Durante la amplificación, a mayor rapidez de alcance del nivel umbral de la señal fluorescente mayor cantidad de secuencia diana original. El valor de fluorescencia se mide por espectrofotometría en la fase en la que tiene lugar la hibridación de los cebadores en la que se unirán a su secuencia complementaria en el DNA molde. El valor de fluorescencia que se toma como referencia corresponde al número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza un valor umbral de fluorescencia, denominado ciclo Ct (*cycle threshold*, ciclo umbral) (figura 2.12). Este valor se corresponde con el inicio de la fase exponencial de la curva de amplificación, en cuyo punto los reactivos no son limitantes y el amplicón se duplica con la máxima eficiencia (Biorad, 2006).

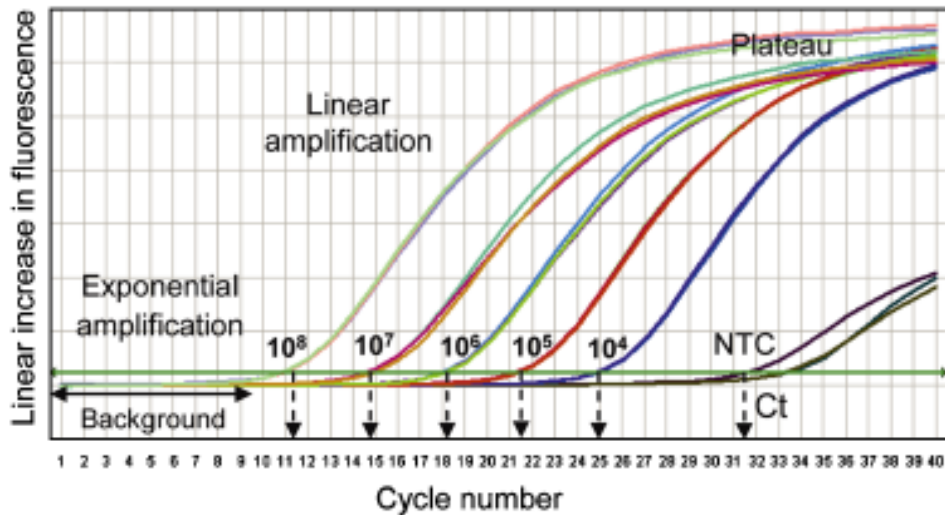


Figura 2.12. Fases de amplificación durante el desarrollo de una RT-PCR (Smith and Osborn, 2009)

Hay una relación inversa entre el Ct y la cantidad de DNA molde que se pone al inicio de la reacción y este es el fundamento de la técnica: a mayor cantidad de DNA *template* (molde) al principio de la reacción de amplificación, menos ciclos son necesarios para que se acumule suficiente producto que dé una señal de fluorescencia detectable (figura 2.13). Como ya se ha indicado, para monitorizar este proceso son necesarios termocicladores con sensores especiales que permitan captar la fluorescencia y medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

En los ensayos realizados para esta tesis doctoral, se cuantificó la fluorescencia de manera absoluta, empleando diluciones seriadas de DNA estándar, de concentración conocida, para construir una recta patrón y con ella interpolar la cantidad de DNA presente en las muestras problema. Si la amplificación ha sido óptima, es decir, se ha dado una duplicación de DNA en cada ciclo, el valor de la pendiente sería -3.32 y la eficiencia real sería 100%. Como se asume que esta condición ideal rara vez se cumple se aceptan como criterios para las rectas de calibrado, eficiencias de entre 90-110%. Eficiencias por encima o por debajo de estos límites son indicadoras de existencia de inhibidores o inespecificidad de los cebadores y exigirían un nuevo diseño de estos últimos. Por otra parte, la curva estándar que conformen las diluciones seriadas del patrón a emplear, debe tener un valor absoluto de coeficiente de determinación (R^2) por encima de 0,980, lo cual garantiza la idoneidad de la línea de regresión para las muestras cuantificadas mediante este método (Biorad, 2006).

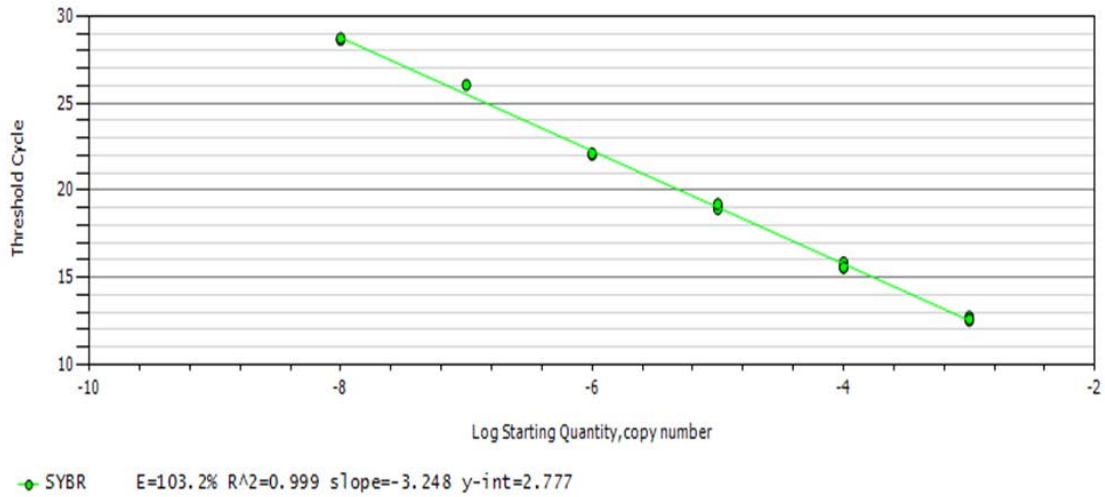


Figura 2.13. Ejemplo de recta patrón en RT-PCR correspondiente a *Lactobacillus* spp

El producto final puede ser caracterizado mediante la aplicación de temperaturas crecientes para determinar cuándo se producen los llamados *melts* o productos de doble hélice. Este punto o *curva de melting* es una propiedad única que depende de la longitud y composición de la secuencia en cuestión. Se basan en el estudio de la temperatura necesaria para disociar el producto de doble hebra de DNA obtenido en la amplificación, o *temperatura de melting*. Esta temperatura depende de la longitud, contenido de guanina y citosina y complementariedad de la secuencia. La formación de un pico único (figura 2.14) es síntoma de especificidad de unión de la sonda al producto específico que a su vez se corresponde con el DNA molde de partida, mientras que la formación de varios picos es indicadora de la unión inespecífica de los cebadores lo que da lugar a dímeros de cebadores o productos de PCR no específicos (Smith y Osborn, 2009).

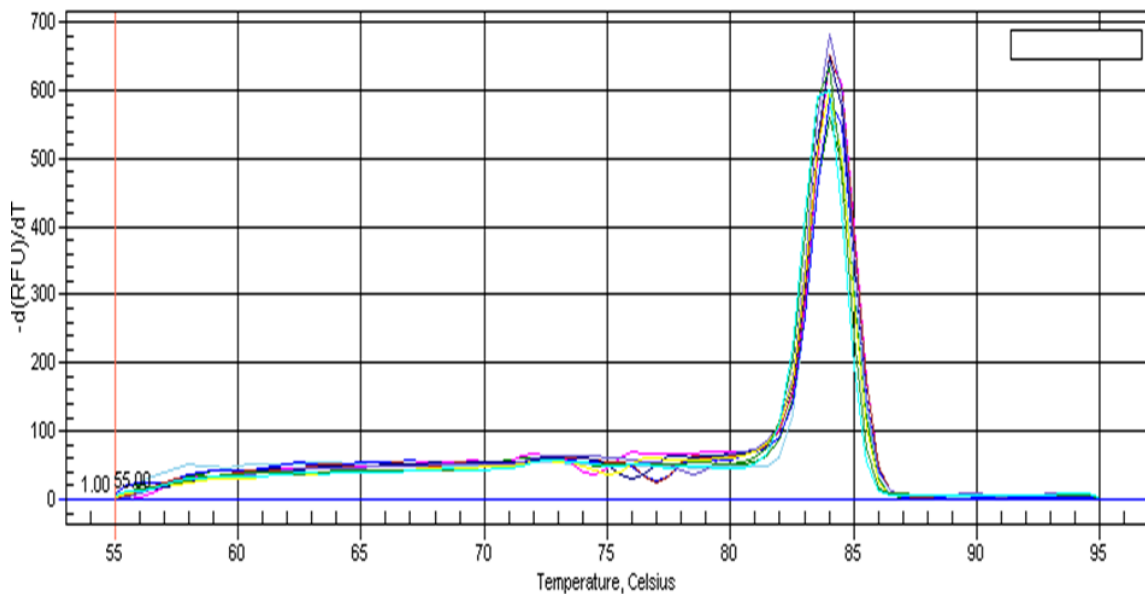


Figura 2.14. Ejemplo de picos de Melting en RT- PCR

Ventajas y desventajas de la RT-PCR:

La RT-PCR ha demostrado ser un método robusto, de alta reproducibilidad y sensibilidad para cuantificar cambios filogenéticos y funcionales en genes en escalas temporales y espaciales en un entorno variante o en condiciones experimentales. Más aún, los datos cuantitativos generados pueden usarse para relacionar variaciones en abundancia de genes y/o niveles de expresión de genes en comparación con variaciones en factores abióticos o bióticos (Smith y Osborn, 2009). A pesar de que existen multitud de métodos que emplean técnicas moleculares para medir cuantitativamente secuencias de ácidos nucleicos, son métodos que tienen bastantes limitaciones como el tiempo que se invierte, el trabajo intensivo, la insuficiente sensibilidad, el no poder cuantificar, necesidad de usar radioactividad o tener una gran posibilidad de contaminación cruzada (Reischl y col., 2002). Frente al resto de métodos, la tecnología que emplea RT-PCR es capaz de identificar y cuantificar ácidos nucleicos en un extraordinario rango de al menos cinco unidades logarítmicas. Por su extrema sensibilidad permite la detección de menos de cinco copias de una secuencia diana, facilitando el análisis de muestras muy diversas (Klein, 2002). Además, la reacción que se lleva a cabo está en un recipiente cerrado que no requiere posterior manipulación y de ese modo se minimizan las oportunidades de contaminación cruzada en el laboratorio.

La principal limitación de esta metodología es que no diferencia bacterias intestinales en estado vivo o muerto, o células no cultivables (Wolffs y col., 2005; Flekna y col., 2007;). También la técnica es susceptible a la inhibición de la reacción por compuestos presentes en ciertas muestras biológicas como hemoglobina o urea (Wilson, 1997). Finalmente, se ha visto que la limitación más importante a la que nos enfrentamos no está relacionada con la tecnología sino con el error humano cuando se desarrollan los ensayos de manera inadecuada, no se analizan bien los datos o se llega a conclusiones erróneas (Valasek y Repa, 2005). En esta línea Selim y col. (2005), comprueban cómo esta metodología demuestra poseer más ventajas que la técnica de PCR convencional reduciendo la contaminación por falsos positivos y enfocada directamente a medir DNA bacteriano en ambientes muy diferentes. También hay que tener en cuenta que proporciona datos en tiempo real sin necesidad de un análisis de punto final en un gel de electroforesis (Valasek y Repa, 2005).

2.7. Antibióticos promotores del crecimiento (AGP)

Desde el descubrimiento de la penicilina por Fleming en el año 1928, multitud de antibióticos, que pueden ser clasificados en base a sus dianas moleculares en las bacterias que afectan, han sido comercializados para el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales y humanos (Diarra y Malouin, 2014). Durante más de 50 años, el uso de antibióticos como aditivos en las raciones para animales ha constituido un elemento más que eficiente y efectivo para controlar la producción del ganado y las enfermedades en el mismo y como promotores del crecimiento (AGP¹) (Looft y col., 2012; Cheng y col., 2014; Dhama y col., 2014). Sin embargo, en el año 1969, el Comité Swan recomienda que el uso de antibióticos como suplemento en raciones animales debiera estar restringido a aquellos que no

¹ Ver p 25.

constituyan agentes terapéuticos para humanos y animales, con el propósito de no dañar la eficacia de los mismos por la aparición de resistencias en ciertas cepas de organismos. De esta manera, antibióticos como avoparcina, radacina, bacitracina zinc, virginiamicina, tilosina, espiramicina, carbadox y olaquinox fueron retirados para su uso en el período de tan sólo dos años, entre 1997-1999 (Yazdi y col., 2014a).

Como ya se ha descrito, la gran diversidad microbiana intestinal tiene multitud de interacciones con las funciones fisiológicas del hospedador (Unno y col., 2015). Dado que los AGP tienen una influencia directa sobre la microbiota, se cree que sus efectos se deben fundamentalmente a la reducción del recuento de determinadas especies bacterianas presentes en el intestino (Visek, 1978a; Jensen, 1998; Close, 2000; Gaskins y col., 2002; Collier y col., 2003). La ausencia de los efectos promotores del crecimiento de los AGP en animales libres de gérmenes y la depresión del crecimiento tras la inoculación bacteriana posterior se han resaltado como los argumentos más fuertes para esta hipótesis, también por ello a veces se hace referencia a los AGP como sustancias que permiten el crecimiento más que sustancias promotoras del mismo (Niewold, 2007). Estos efectos quedan aún más claros cuando se trata de una infección generalizada o grave (Page, 2006). Se considera por tanto que su modo de acción está vinculado de manera primaria a su actividad antibacteriana, más que a un efecto directo en la fisiología de los animales (Stanley y col., 2004; Dibner y Richards, 2005). Los antibióticos parecen ser más efectivos si se emplean antes de que la microbiota se establezca (Unno y col., 2015), probablemente debido a que el momento del desarrollo inicial en el que se encuentra el animal es vital para la colonización del GIT por las especies bacterianas². Sin embargo, aunque la microbiota provee beneficios reales al animal³, su presencia supone también un coste debido fundamentalmente a la competencia por los nutrientes y la producción de catabolitos procedentes de los aminoácidos, la disminución de la digestibilidad de las grasas y el aumento de la necesidad de la secreción de moco y recambio celular del epitelio intestinal (Dibner y Richards, 2005).

De acuerdo con la información bibliográfica, los mecanismos por los que los diferentes AGP dan lugar a incrementos en los índices productivos se incluyen habitualmente en alguno o varios de los siguientes grupos:

- i) Modulación de la microbiota intestinal a través de dos posibles vías, la primera podría ser la reducción de la carga bacteriana total mediante el desarrollo de una mayor competencia microbiana entre la microbiota endógena y los AGP derivada de la presencia de estos últimos (Niewold, 2007), se considera que una menor carga microbiana intestinal puede dar lugar a incrementos en los niveles de aminoácidos disponibles para el animal en el intestino debido a que los AGP impiden la síntesis de ácidos nucleicos (Hardy y col., 2002) y dan lugar a una mejora en el balance nitrogenado mejorando la disponibilidad de nitrógeno (Visek, 1978a; Anderson y col., 1999). La segunda vía más probable y que se supone el principal modo de acción de los AGP puede deberse a la regulación y el mantenimiento de un balance óptimo de la microbiota intestinal (entre organismos Gram positivos y Gram negativos). Esta regulación se ve influida por la protección de la mucosa intestinal por parte de los

² Ver p 47 y 48.

³ Ver p 49.

AGP, ayudando en el revestimiento de una capa protectora que sirve de barrera contra los microorganismos enteros patógenos y también frente a las altas concentraciones luminales de moléculas que actúan como moduladoras del sistema inmune, disminuyendo de esta forma el daño que ocasionan en el hospedador las fluctuaciones dietéticas (Dhama y col., 2014; Dupont, 2014). Además, los antibióticos ejercen un efecto directo potencial sobre el intercambio de nutrientes interbacteriano debido al incremento relativo del recambio de subunidades moleculares y celulares en el intestino grueso y se encargan de la inducción de profagos con lo que contribuyen de manera indirecta al ciclo de nutrientes microbiano ya que estos fagos median un tipo de intercambio genético entre bacterias del intestino (Allen y col., 2011; 2014).

- ii) Inhibición de las infecciones subclínicas mediante la prevención de la multiplicación de las bacterias patógenas o potencialmente patógenas (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp, etc.), y reducción en la incidencia de diarrea o enteritis no específicas (George y col., 1982; Brennan y col., 2003). Durante el estrés o perturbaciones digestivas, el número de patógenos como *E. coli* u otros Gram negativos aumenta llevando a una falta de balance en la microbiota. Las bacterias Gram negativas colonizan el intestino, se adhieren al epitelio intestinal y causan inflamación de la mucosa intestinal que reduce la absorción de nutrientes y a cambio retarda el crecimiento y la productividad de los pollos, situación que puede corregirse con el uso de los AGP ya que tienen la habilidad de alterar procesos como la biosíntesis de la mucina y la modificación en ésta dinámica influye la función intestinal mejorando la ingesta de nutrientes y mejorando así el rendimiento productivo de los animales en el transcurso de la enfermedad (Dhama y col., 2014). Los AGP son capaces de dar lugar a la supresión de infecciones subclínicas de ciertos patógenos en el tracto gastrointestinal, como es el caso de la salinomina con *C. perfringens* (Engberg y col., 2000; Johansen y col., 2007). El coste inmunológico y metabólico de las infecciones subclínicas es muy alto cuando se trata de la cría de animales destinados al consumo humano (Allen y col., 2014), en este sentido, una revisión de la literatura revela que los AGP han sido muy efectivos durante años en la prevención de la coccidiosis en las granjas de explotación aviar (Prescott, 1979; Elwinger y col., 1998; Vissienon y col., 2000; Williams, 2005). Algunos autores (Willing y col., 2011; Kamada y col., 2012) sugieren que la competición con otras bacterias relacionadas metabólicamente regula la colonización de los patógenos entéricos y oportunistas. Los AGP producen la pérdida de ligandos (moléculas de unión) bacterianos que son reconocidos por el hospedador, alteraciones en los metabolitos producidos por la microbiota y la pérdida de señales específicas bacterianas (Willing y col., 2011). Las interacciones ecológicas quedan demostradas en modelos de colonización que engloban miembros importantes de la microbiota intestinal (Samuel y Gordon, 2006). Los microorganismos pueden ser dependientes sobre otros colonizadores para el aprovisionamiento de nutrientes o metabolitos secundarios (Belenguer y col., 2006). Los AGP pueden acumularse también en las membranas del citoplasma de bacterias sensibles, disipando los gradientes iónicos y desacoplando la hidrólisis de ATP de las funciones esenciales para el crecimiento celular y la supervivencia (Allen y col., 2014). En definitiva, los AGP puede afectar de manera específica ciertas especies bacterianas, pero, otras relacionadas metabólicamente podrían verse indirectamente afectadas, situación que

se ha dado con antibióticos como la vancomicina que tiene su actividad centrada de manera estricta en las Gram positivas y sin embargo, en un estudio se comprobó cómo su uso provocaba el acusado descenso de la población de las Gram negativas (Robinson y Young., 2010).

- iii) Modulación directa del sistema inmune, mediante la disminución de su coste energético , ya que los AGP dan lugar a que se cedan calorías extra para la ganancia de peso al reducir la carga microbiana en el GIT llevando a una mayor biodisponibilidad nutricional para el animal y un menor substrato para que los organismos bacterianos lo usen para su propio crecimiento; los AGP también influyen en el metabolismo bacteriano de los carbohidratos, reduciendo la producción de ácidos grasos volátiles y mejorando la disponibilidad de nitrógeno por el ahorro de aminoácidos esenciales (Hardy y col., 2002; Huyghebaert y col., 2011). En relación con esto, Niewold (2007) propuso que los AGP pueden tener un mecanismo de acción de naturaleza no antibiótica y antiinflamatoria que consiste en la mejora del rendimiento productivo del animal mediante la acumulación de antibióticos en las células intestinales inflamatorias, la concentración extracelular de los AGP es demasiado pequeña para ejercer un efecto antimicrobiano, las células fagocíticas (como los macrófagos) pueden acumular estas sustancias dando lugar a la atenuación de la respuesta inflamatoria. La consecuencia que se deriva de esto es la bajada de los niveles de citoquinas proinflamatorias que resulta en un estímulo catabólico menor. Parece ser que existe una buena relación entre la inhibición de la función inflamatoria y el uso de los AGP, los antibióticos son capaces de inhibir algunas de las funciones de las células inflamatorias como la producción de especies de oxígeno reactivas y el descrito anteriormente de las citoquinas. Por tanto, estos antibióticos son capaces de inhibir la respuesta aguda inflamatoria que se produce ante una situación de estrés o de enfermedad y que claramente está asociada con el enorme gasto fisiológico por parte del hospedador derivado del catabolismo del tejido muscular que llevaría al descenso del rendimiento productivo (Humphrey y Klasing, 2003).
- iv) Incremento en la captación de nutrientes a través de las paredes intestinales por el adelgazamiento de la lámina propia de la mucosa. Esto se produce por un mayor uso de nutrientes ya que la superficie de absorción del intestino se ve aumentada y esto permite una mayor contribución del GIT al gasto de energía corporal (Pond y col., 1988; Niewold, 2007) optimizando el índice de transformación, la ganancia de peso, el rendimiento y la productividad (Dhama y col., 2014; Anderson y col., 1999). También se ha descrito que los AGP aumentan los genes funcionales microbianos relacionados con la producción energética y la conversión, los genes que se encargan de codificar estas funciones son seleccionados por los antibióticos, un aumento en esta proporción de genes codificadores de la producción energética y las funciones de conversión podría ser un factor importante en las propiedades de promoción del crecimiento que tienen estas sustancias, ya que estarían implicadas en funciones relacionadas con la mejora de la eficiencia alimentaria (Looft y col., 2012). En relación con esto, estudios recientes muestran que el efecto promotor del crecimiento de los antibióticos puede estar relacionado con la disminución de la actividad de la hidrolasa de las sales biliares (BSH), enzima producida principalmente por lactobacilos. La hidrólisis de las sales biliares puede ejercer un impacto negativo sobre la utilización y digestión de la grasa

(Lin, 2014). Más recientemente se ha observado que estos ácidos biliares pueden estar incluso implicados en señalización metabólica y endocrina, pudiendo ser empleados estos factores de señalización de manera terapéutica en aspectos como la motilidad gastrointestinal, la absorción de fluidos y la función intestinal. (Burrin y col., 2013; Allen y col., 2014).

En el año 2000, la OMS recomienda no usar los AGP como agentes profilácticos en los piensos y preparados diseñados para alimentar a los animales de consumo humano, basándose en el hecho de que estos animales pueden ser reservorios de resistencias antibióticas en diversas poblaciones bacterianas, que podrían ser transferidas a los humanos (Ubeda y Pamer, 2012). De hecho, uno de los primeros casos de resistencia en animales criados para consumo humano fue descubierto por Starr y Reynolds (1951). Tras una serie de ensayos con pavos, en los cuales se suplementaba con el antibiótico estreptomina (Stanton y Humphrey, 2011; Looft y col., 2012) entre otros, y el trabajo de los expertos en este tema (Bedford, 2000; Dibner y Richards, 2005; Niewold, 2007), se llegó a la conclusión de que además la resistencia antibiótica por el uso de AGP daba lugar a multitud de problemas derivados del detrimento en el rendimiento productivo del animal, ya que al alterar los antibióticos los microbiomas comensales podrían eliminar una barrera protectora, dejando al hospedador susceptible a la colonización por patógenos y especialmente aquellos que se ingieren, tanto los efectos directos que crea este problema (competencia entre microorganismos por hábitats o nichos o supresión de los mismos por armas químicas o moleculares) como los efectos indirectos (supresión de la inmunidad del hospedador o activación de las respuestas inmunes) podrían estar implicados en esta resistencia (Allen y col., 2014). Por otra parte, también se ha observado que la eliminación de microorganismos en el GIT por el continuo uso de antibióticos puede desembocar en pérdidas de vitaminas del grupo B y K y también provocar el crecimiento compensatorio de microbiota saprófita, comensal, no patógena, hongos y levaduras en el intestino e incluso aumentar su virulencia (Dhama y col., 2014), justo lo que quería corregirse o evitarse con su uso anterior. La prohibición de los AGP por parte de la UE a partir de en 2006 ha llevado a la búsqueda de estrategias alternativas⁴. Una de estas estrategias consiste en el uso de los aditivos capaces de ayudar en el control del estado sanitario y bienestar de los animales, aumentar la calidad del alimento de origen animal y mejorar los rendimientos económicos y productivos de las explotaciones. Sin embargo, este tipo de suplementos no pueden comercializarse sin más ya que necesitan demostrar que no producirán efectos nocivos en el animal, el hombre o el medio ambiente, siendo evaluados científicamente. Según la norma (EC No 1831/2003 y No 767/2009), sólo los aditivos que hayan superado ciertos procedimientos podrán estar en el mercado. Estas autorizaciones estarán garantizadas para especies animales específicas, condiciones específicas de uso y durante períodos de 10 años (EC, 2001).

⁴ Ver p 25.

2.8. Búsqueda de sustancias alternativas empleadas como aditivos. El Ajo y sus derivados: antecedentes históricos, composición química y efectos antimicrobianos

2.8.1. Alternativas a los AGP

Como se ha indicado anteriormente, deben buscarse sustancias de origen natural o artificial capaces de sustituir parcial o totalmente a los AGP, es decir, con efectos similares a ellos, pero, sin sus inconvenientes. Para ello, contamos con diferentes alternativas en nutrición del animal que se siguen explorando en este momento (Dahiya y col., 2006; Zakeri y Kashefi, 2011; Seal y col., 2013). En concreto, (Tabla 2.4), contamos con probióticos y prebióticos, sustancias antimicrobianas, ácidos orgánicos, enzimas, hierbas medicinales y extractos vegetales, como los derivados del ajo (alicina y tiosulfatos) entre otros (Toghyani y col., 2010; Landy y col., 2011; Goodarzi Borojani y col., 2014a).

Aditivo	Posible mecanismo de acción
Antibióticos Promotores del Crecimiento (AGP)	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción del consumo de nutrientes por parte de la microbiota entérica • Reducción del grosor de la pared intestinal e incremento en la absorción • Control de los patógenos oportunistas e infecciones subclínicas (exclusión competitiva) • Reducción en la cantidad de metabolitos depresores del crecimiento (amoníaco, etc.)
Extractos de plantas y aceites esenciales (aditivos fitogenéticos)	<ul style="list-style-type: none"> - Efecto antimicrobiano (bactericida/bacteriostático) - Estimulación de la actividad enzimática pancreática e intestinal - Estimulación de la ingestión y mejora de la salud de las vellosidades intestinales - Potenciación del sistema inmune - Efecto antioxidante
Prebióticos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación selectiva del crecimiento o actividad de bacterias beneficiosas comensales • Exclusión competitiva indirecta • Bloqueo de receptores bacterianos • Arrastre de bacterias patógenas/potencialmente patógenas
Probióticos	<ul style="list-style-type: none"> - Exclusión competitiva directa (aumento de la resistencia a la colonización por patógenos) - Aumento de integridad intestinal, aumento de la actividad enzimática, neutralización de enterotoxinas, inmunomodulación, disminución del pH y adsorción de patógenos Gram
Ácidos orgánicos	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición del crecimiento microbiano por disminución del pH. • Antimicrobiano por disociación del ácido en el interior de la bacteria: • Elevada digestibilidad y aporte de energía.
Otros: Enzimas: carbohidrasas, fitasas β-D-glucanos Taninos y polifenoles	<ul style="list-style-type: none"> - Estimulación inespecífica del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, células NK) - Actividad antibacteriana y antioxidante - Control de enfermedades alimentarias y patógenos - Actividad prebiótica modificando de manera beneficiosa la microbiota ileal - Incremento en la absorción de nutrientes

Tabla 2.4. Posibles mecanismos de acción de las sustancias alternativas a los AGP (Adaptado de Dibner y Richards, 2005; Santomá y col., 2006)

Dado que el presente estudio se ha centrado en la evaluación de la posible utilidad de un derivado del ajo obtenido industrialmente, como es el PTS-O, haremos una descripción algo más pormenorizada de los derivados fitogenéticos (PFA). Los aditivos alimentarios de origen fitogenético comprenden una amplia variedad de hierbas, especies y productos derivados de estos componentes que incluyen aceites esenciales que han demostrado tener beneficios en la producción de animales destinados al consumo humano (Windisch y col., 2008; Wallace y col., 2010). A estos productos se les han atribuido efectos tales como controlar y limitar el crecimiento y la colonización de una amplia variedad de especies bacterianas patógenas y potencialmente patógenas en el intestino de las aves (Goodarzi Borojeni y col., 2014a). Además, se les atribuye aumentar el rendimiento productivo y la digestibilidad de nutrientes de los broilers (Zulkifli y col., 2012; Yazdi y col., 2014a), la capacidad antioxidante (Giannenas y col., 2005; Florou-Paneri y col., 2006), la actividad coccidiostática (Chirstaki y col., 2004; Florou-Paneri y col., 2006), la capacidad inmunoestimuladora (Landy y col., 2011) y la actividad antimicrobiana (Botsoglou y col., 2010). Además han sido aceptados por los consumidores como aditivos naturales (Toghyani y col., 2010; Nanekarani y col., 2012).

De acuerdo con Kamel y col. (2001), los extractos de plantas pueden dar lugar a una mayor eficiencia en la utilización del alimento en pollitos broiler, teniendo como resultado un aumento en su crecimiento. Existen bastantes evidencias de que las hierbas, especies y varios extractos de plantas producen un estímulo en el apetito y en la digestión de los pollitos. Se sabe también que los extractos de plantas contienen diferentes moléculas que tienen bioactividad intrínseca sobre la fisiología animal y el metabolismo (Hernández y col., 2004). De acuerdo con Amad y col. (2011), los compuestos que contienen PFA, como una mezcla de aceites esenciales, especies o hierbas, incluidos como aditivos en la dieta de pollos broiler, dan lugar a una mejora en el rendimiento productivo y la digestibilidad ileal de grasa, proteínas y minerales. En este sentido, la planta conocida como “centella asiática” (*Centella asiática*), de la familia de las *Apiaceae*, tiene una serie de componentes bioactivos que gozan de propiedades antimicrobianas contra bacterias intestinales tales como *Escherichia coli* (Norzaharaini y col., 2011). Del mismo modo, el anís, también de la familia de las *Apiaceae*, es una planta aromática cuya semilla ha mostrado favorecer el crecimiento de pollos de engorde aplicando en sus dietas concentraciones variadas de este compuesto (Yazdi y col., 2014a). Otra planta a destacar por sus propiedades beneficiosas es la llamada *Tribulus terrestris* L (abrojo), de la familia de las *Zygophyllaceae*, una maleza que empleada como aditivo en las dietas de pollitos broiler ha demostrado influir de manera positiva en el rendimiento productivo (Yazdi y col., 2014b).

En el caso de los taninos, compuestos fenólicos naturales, varios autores han estudiado el gran beneficio que supondrían, particularmente en el control de enfermedades alimentarias y patógenos que las causan, si se incorporaran en las dietas de animales destinados al consumo humano, especialmente en aves (Van Parys y col., 2010; Anderson y col., 2012; Redondo y col., 2013; Tosi y col., 2013). Respecto a los productos procedentes de alimentos vegetales nos encontramos con los polifenoles de la uva, los cuales han demostrado una actividad prebiótica modificando de manera beneficiosa la microbiota ileal de pollos broiler que los han tomado como suplemento en su dieta y modificando la estructura histológica de la mucosa intestinal dando lugar a un incremento en la capacidad de absorción de nutrientes en la misma (Viveros y col., 2011).

Los aceites esenciales son compuestos volátiles que se extraen de plantas por destilación al vapor y tienen una gran variedad de propiedades beneficiosas (Weber y col., 2012). En este sentido, la toma como aditivo de estos aceites esenciales se ha demostrado que puede aumentar la secreción de enzimas digestivas, y por tanto mejorar la digestibilidad del pienso y favorecer el rendimiento productivo de los broilers (Radwan y col., 2008; Al-Kassie, 2011; Weber y col., 2012), así como facilitar el control de la proliferación del patógeno *C. perfringens* en el intestino de estos animales (Mitsch y col., 2004).

Los antimicrobianos bacterianos son antibióticos bacterianos naturales codificados genéticamente que recientemente han ganado atención, particularmente sus derivados peptídicos (AMP), los cuales pueden proporcionar una respuesta protectora frente a infecciones bacterianas (Seal y col., 2013). Choi y col. (2013) indican que una sustancia antimicrobiana como el péptido A3 administrada en la dieta de broilers, puede mejorar el crecimiento, la retención y digestibilidad de nutrientes, la morfología intestinal e incluso reducir las bacterias patógenas en diferentes secciones intestinales de estas aves, pudiendo por tanto sustituir a los AGP. Wen y He (2012) obtienen resultados similares empleando en la dieta un péptido híbrido de la cecropina procedente de un tipo de insecto (*Hyalophora cecropi*), y también Wang y col. (2011b) con la albusina B, bacteriocina procedente de la bacteria *Ruminococcus albus*.

Los llamados microorganismos alimentarios directos (DFM), una fuente de microorganismos beneficiosos vivos, son microorganismos comensales empleados como aditivos alimentarios que pueden constituir una alternativa bastante efectiva a los antibióticos en la industria alimentaria animal debido a su función diversificada sobre la salud animal y su productividad. En general especies de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces* spp se emplean frecuentemente como DFM en la industria alimentaria aviar. El interés de este tipo de suplementos para la industria avícola reside en que promueven el balance y calidad de la microbiota intestinal del animal. Sin embargo, la eficacia de estos productos varía en función de cómo se haya producido y su aplicación práctica (Salim y col., 2013). Estos autores comprobaron que efectivamente la suplementación con los DFM aportó beneficios respecto a la mejora del rendimiento en el crecimiento de los pollitos a una edad temprana. De acuerdo con Murugesan y col. (2014), la suplementación de DFM en combinación con la enzima xilanasas mejora el rendimiento productivo de pollitos broiler actuando mediante mecanismos de acción sinérgicos, funcionando de manera parecida a como lo haría un prebiótico. En esta línea, *Bacillus amyloliquefaciens* mostró poseer un efecto positivo sobre la ganancia de peso y el índice de transformación y también sobre la digestibilidad en parámetros como la AMEn o la energía bruta en aquellos broiler que tomaron una dieta suplementada con este DFM respecto a los broiler que tomaron la dieta control. Se ha visto como la mejora de los parámetros productivos va relacionada con el efecto positivo de la utilización nutricional (Lei y col., 2015).

Los prebióticos (sustancias) y probióticos (células vivas) son aditivos capaces de afectar beneficiosamente al animal mediante la mejora de su balance microbiano a nivel intestinal. Los prebióticos son sustancias no digeribles que afectan al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de especies de bacterias ya residentes en el colon para mejorar la salud del hospedador. Se

denomina probióticos a los suplementos microbianos que afectan de manera beneficiosa al hospedador mediante la mejora de su balance intestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). El término simbiótico se emplea para mezclas de prebióticos y probióticos que puedan tener efectos beneficiosos en sistemas gastrointestinales animales o humanos (Kolida y Gibson, 2011). Como ejemplos de prebióticos podemos señalar a los mananoligosacáridos (MOS), que han mostrado potencial como prebiótico en pollos (Abd El-Khalek y col., 2012). Kim y col. (2011) testaron la influencia de MOS y FOS (fructooligosacáridos) como suplementos en la alimentación de pollitos comprobando un aumento en la diversidad y cantidad de las poblaciones de *Lactobacillus spp* y disminuyendo las poblaciones de *E. coli* y *C. perfringens* en el íleon. De Barros y col. (2015) demostraron el impacto positivo que tuvo la adicción en las raciones de pollos broiler de MOS con respecto a los parámetros productivos, tanto la ingesta diaria como el incremento de peso fueron mayores en respuesta al tratamiento hasta los 21 días de edad y a los 42 días de edad respectivamente; además, se mejoró notablemente el índice de transformación en esta última etapa. Por otra parte, los pollos que tomaron las dietas a las que se adicionó MOS y FOS consiguieron mejorar el peso corporal y el índice de transformación respecto a los pollos que tomaron la dieta control durante los 35 primeros días de ensayo (Ao y Choct., 2013). De acuerdo con Saleh y col. (2014), la suplementación con FOS de la dieta de broilers con dos semanas de edad mejoró la digestibilidad y el rendimiento productivo en cuanto a aumento del peso corporal y mejora del índice de transformación de los mismos. Otro prebiótico ensayado con cierta frecuencia en broilers es la inulina. Swiatkiewicz y Arczewska-Wlosek (2012) atestiguan que este aditivo ha sido ampliamente utilizado para sustituir a los AGP en multitud de estudios, demostrando su eficacia para la mejora de parámetros como la mejora del rendimiento productivo, la absorción de nutrientes o la microbiota intestinal. Así por ejemplo, Peinado y col. (2013b) demostraron que su adición en las dietas produjo una mejora tanto en el rendimiento productivo, como en la digestibilidad de nutrientes y mejoró el balance de la microbiota del GIT, al igual que Rodríguez y col. (2012) que observaron resultados similares en broilers. Elrayeh y col. (2012) y Sang-Oh y Byung-Sung (2011) prueban su eficacia en la mejora de los parámetros productivos, al igual que Sen y col. (2012) aportando además una mejora en la digestibilidad de nutrientes, y Awad y col. (2011) demuestran lo propio con la histología de la mucosa intestinal.

Por lo que se refiere a los probióticos, habría que mencionar que empleando *Bacillus subtilis* como probiótico en la dieta de broilers éste es capaz de mejorar el rendimiento productivo a nivel de ganancia de peso de los pollitos (Lee y col., 2014) y Park y Kim. (2014) obtienen resultados similares además de una disminución en la población de *Salmonella* en el intestino. La mezcla de *B. subtilis* y *Clostridium butyricum* empleados como probióticos en la dieta de pollos broiler incrementó el rendimiento productivo de los mismos (Chen y col., 2013) y *C. butyricum* administrado en solitario provocó los mismos efectos (Zhao y col., 2013). Ahmed y col. (2014) emplean *Bacillus amyloliquefaciens* para mejorar la productividad y disminuir la población de *E. coli*, demostrando su eficacia como probiótico. Song y col. (2014) mostraron que la suplementación en la dieta con una mezcla de probióticos disminuyó el índice de transformación en broilers. La administración de un probiótico múltiple dio lugar a una mejora en los parámetros productivos y la digestibilidad de nutrientes (Kim y col., 2012b). Otra opción que se plantea a la hora de administrar un microorganismo que presumiblemente tendrá actividad probiótica es la encapsulación, como es el caso de una cepa concreta de

Enterococcus faecalis, responsabilizada de una mejora en la productividad y en la diversidad y composición de microorganismos intestinales beneficiosos en pollos broiler (Han y col., 2013). El género *Bifidobacterium* ha demostrado tener un efecto probiótico positivo en aves (Baffoni y col., 2012; Mountzouris y col., 2007; Santini y col., 2012). La concentración de *C. jejuni* se redujo en las heces de pollos que han tenido un suplemento dietético de *B. longum* (Santini y col., 2012)

2.8.1.1. Alternativas a los AGP que modifican la composición de la microbiota digestiva en aves.

Se han ensayado muchos extractos de plantas con capacidad para modificar la composición de la microbiota digestiva en aves. Así, Kasapidou y col. (2014) prueban que la adición a la dieta de bálsamo de melisa (*Melissa officinalis*) en un ensayo realizado con broilers a una concentración de 5 g/Kg de dieta disminuyó el número de copias de *C. jejuni* en los análisis realizados en la carne de pollo. En el caso de *C. perfringens* la información bibliográfica indica que esta bacteria es bastante resistente a antibióticos que poseen diferente naturaleza y mecanismo de acción, tanto los aplicados en salud humana como los empleados en cuidado animal (Martel y col., 2004; Slavić y col., 2011; Voidarou y col., 2011). De hecho, todavía se desconoce el mecanismo preciso que está detrás de la resistencia de este patógeno a los tratamientos antibióticos y al efecto de los compuestos naturales como el ajo y sus derivados. Osman y Elhariri (2013) testan *in vitro* la capacidad antimicrobiana de un grupo considerable de antibióticos frente a este patógeno y concluyen que tiene una gran resistencia a la acción de todos ellos. El timol adicionado a la dieta de broilers no redujo de manera significativa el número de *C. perfringens* en el GIT (Cross y col., 2007). Abudabos y col. (2013) señalan los mismos resultados con la suplementación en dieta de una mezcla de aceites esenciales. Sin embargo, Kim y col. (2014), refieren lo contrario cuando emplean un bacteriófago dietético en las dietas de broilers, el cual permite la disminución del recuento microbiano de este patógeno en los contenidos cecales. De acuerdo con estos autores, la razón para la variabilidad en los resultados puede estar asociada con las diferencias entre los animales presentes en el estudio, el ambiente que los rodea y la composición dietética entre los distintos experimentos. *C. perfringens* es capaz, aparte de la producción de toxinas, de suprimir ciertos miembros de la flora intestinal habitual lo cual confiere un perjuicio extra dado que el desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal puede acelerar la progresión de la enfermedad (Feng y col., 2010; Stanley y col., 2012). Además, las circunstancias medioambientales pueden de manera directa o indirecta influir en la flora intestinal normal, la colonización, el crecimiento y la producción de toxinas de este patógeno y por ende de la enfermedad intestinal (Songer, 1996; Schotte y col., 2004). De acuerdo con Allaart y col. (2013), la cantidad administrada de aditivo puede ser crucial a la hora de reducir las poblaciones de este patógeno, razón por la que ciertos aditivos de naturaleza prebiótica como los FOS pueden no ejercer un efecto antimicrobiano. En el caso de MOS el efecto es inconsistente entre estudios, debido a factores dietéticos, de dosis y período de administración del aditivo.

2.8.1.2. Alternativas a los AGP que tienen efecto sobre la digestibilidad de nutrientes y la estructura histológica del intestino.

Muchos estudios acerca del uso de alternativas a los AGP se han centrado en sus propiedades antioxidantes o antimicrobianas. Sin embargo, muy pocos han informado acerca de sus efectos sobre la utilización de los nutrientes o la energía y la morfología del intestino. Olukosi y Dono (2014) observaron que aditivos tales como el ácido benzoico o la cúrcuma administrados en la dieta de broilers mejoraban claramente la utilización de la energía y la retención de nitrógeno. En este sentido, la suplementación con virginiamicina y *Bacillus amyloliquefaciens* de raciones para broilers aumentó de manera significativa la digestibilidad aparente total de la energía bruta durante las fases iniciales y finales del ensayo (Lei, 2015). Swiatkiewicz y col. (2014) comprobaron como la suplementación con quitosano, polisacárido compuesto de cadenas de glucosamina, en una cantidad de 0,015 %, dio lugar a un incremento en la digestibilidad ileal de diversos nutrientes. Mandalawi y col. (2014) evidenciaron que la inclusión de glicerol crudo dio lugar a una mejora de la digestibilidad ileal de la energía bruta y del resto de los nutrientes evaluados a excepción del nitrógeno. En el experimento llevado a cabo por Liu y col. (2014) los broilers que tomaron la dieta suplementada en fitasa mejoraron sus valores de AMEn y digestibilidad ileal de N, aumentando su retención. Masey-O'Neill y col. (2014) demostraron lo propio con la administración de xilanasa exógena. Zhang y col. (2014) validaron cómo la suplementación con xilanasa en la dieta de broilers aumentó de manera significativa la digestibilidad ileal de NSP solubles e insolubles, lo que sin embargo no afectó a la digestibilidad de la grasa. Existen bastantes estudios que señalan que los aceites esenciales procedentes de plantas pueden mejorar la digestibilidad (Frankic y col., 2009; Goodarzi y Nanekarani, 2014). La inclusión de determinados productos comerciales compuestos por mezclas de aceites esenciales mostraron mejoras en la digestibilidad aparente total de la grasa (Hernandez y col., 2004). Theron y Lues (2007) comprobaron que la adición de una mezcla de aceites esenciales derivados del orégano, anís y naranja amarga a dosis de 125 mg/kg mejoró ese mismo índice, y Stanačev y col. (2011) llegaron a conclusiones similares en su investigación en la que empleaban aceite de colza. Kiarie y col. (2014) demostraron que la adición de xilanasa en las dietas de broilers mejoró la digestibilidad y retención de los compuestos fibrosos. Attia y col. (2012) llegaron a similares conclusiones con la adición de un complejo multienzimático a la dieta. En cerdos, la administración en dieta de una mezcla de aceites esenciales y ácidos orgánicos dio lugar a la mejora en la digestibilidad ileal de la energía bruta (Cho y col., 2014), como también observaron Walsh y col. (2013) en cerdos destetados tras la administración de quitooligosacáridos (COS) en su dieta. Es importante destacar que de acuerdo con la normativa de la UE los aditivos alimentarios tienen que demostrar la identidad y trazabilidad a lo largo de todo el proceso comercial del producto, la eficacia de los efectos nutricionales, incluida la ausencia de posibles interacciones con otros aditivos alimentarios, y la seguridad del animal, del trabajador y el consumidor de los productos, y por último, aunque no menos importante, del medioambiente (Windisch y col., 2008).

2.8.2. Antecedentes históricos del ajo y sus derivados como aditivos alimentarios

El género *Allium* incluye alrededor de 550 especies pertenecientes a la familia *Liliaceae* (Block, 2010), de las cuales un número reducido son muy importantes como plantas alimenticias y como drogas en medicina tradicional, especialmente cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*) (Goodarzi Boroogeni y col., 2014a). El ajo contiene una concentración de componentes sulfurados como el dialil sulfato, la aliina, el ajoeno y la alicina en concentraciones mayores que el resto de las especies del género, además de numerosas enzimas, aminoácidos y minerales como el selenio. Los componentes sulfurados son los responsables tanto del fuerte olor que posee el ajo como de sus efectos medicinales (Block, 2010; Newall y col., 1996; Simonetti, 1990). El origen del cultivo de la cebolla, el ajo, el puerro y la cebolleta, entre otras de las muchas especies que pertenecen al género *Allium*, ha sido recientemente documentado como procedente de países como Afganistán, Kazajistán, Kirguistán, Pakistán, Tayikistán, Turkmenistán, Uzbekistán y el norte de Irán (Rabinowitch y Currah, 2002; Brewster, 2008).

Los antecedentes en el uso de remedios naturales con fines medicinales y terapéuticos se remontan al año 2.600 A.C., ya que existe un compendio de medicina natural escrito en las "Clay Tables" que data de esta época. Este escrito mesopotámico incluye prescripciones para el uso de *Papaver somniferum* (jugo de amapola), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), especies de cedro, etc. para el tratamiento de infecciones producidas por parásitos y alimentos. Otros textos antiguos como el "Código Egipcio Ebers" (*Ebers Papyrus*), el "papiro mágico griego" y el chino "Materia Medica" también están copados de registros del uso de plantas y extractos de plantas en medicina (Newman y col., 2000; Block, 2010). El Papiro Ebers y el Papiro Mágico mencionan expresamente el uso de extractos de ajo con propósitos medicinales. Virgilio, el poeta romano del S I a. C., hace hincapié en su uso para tratar picaduras de serpientes en uno de sus escritos (Koch y Lawson, 1996) y el famoso médico griego, Hipócrates, describía su eficacia tratando neumonía y heridas abiertas en su *Corpus Hippocraticum* (Castiglioni, 1978). En la época en que los faraones dominaban Egipto, durante la construcción de la gran pirámide de Keops en Guiza, se suplementaba con ajo la dieta de los trabajadores para aumentar el rendimiento en sus labores diarias, debido a la fuerza y resistencia atribuidas al consumo de esta planta (Rahman, 2007). Además, como dato curioso se ha descubierto que algunos dientes de ajo fueron encontrados en la tumba de Tutankamon. Los faraones creían que llevándose este alimento a la otra vida, la comida siempre estaría bien sazonada. También hay constancia de que el ajo estaba asociado a las costumbres israelitas y se menciona en la Biblia (Nm 11,5) durante la época del Éxodo. Más recientemente, durante una plaga en Marsella (Francia), en 1721, se consideró que cuatro empleados encargados de mover los cuerpos de los muertos no fueron contagiados debido a que tomaron un vinagre enriquecido con ajo macerado llamado "viniagre des quatre voleurs" (Harris y col., 2001). En India, el ajo se ha usado desde hace décadas para prevenir las infecciones en heridas abiertas y como conservador en la comida perecedera (Arora y Kaur, 1999). En Irlanda, a finales del siglo XX, el ajo fue empleado para combatir la infección pulmonar (Delaha y Garagusi, 1985). Como puede verse, las diversas utilizaciones que ha recorrido el ajo a lo largo de la historia han sido bastante variopintas, desde repelente para vampiros y antídoto para la rabia, hasta su relativamente reciente uso por las comadronas de origen griego para ahuyentar el "mal de ojo" en los paritorios (Block, 2010).

2.8.3. Química y propiedades funcionales del ajo y su componente principal, la alicina

Con todo, no fue hasta mediados del siglo pasado cuando Cavallito y Bailey (1944) aislaron y describieron las propiedades de la alicina (dialil tiosulfínico o dialil disulfato), el compuesto responsable del fuerte olor del ajo, empezando así lo que han sido décadas de investigación de este compuesto, el llamado “corazón del ajo” (Josling, 2007). De hecho, la actividad antibacteriana del ajo es debida principalmente a la alicina (Avato y col., 2000). En este sentido, igualmente se ha visto que las propiedades antibacterianas y antifúngicas del jugo de ajo son debidas a la inhibición de la succinato deshidrogenasa mediante la inactivación del grupo tiol, permitiendo su uso como inhibidor potente de patógenos alimentarios e incrementando a su vez la vida útil de los alimentos procesados (Melvin y col., 2009). El ajo, como otras plantas, tiene un sistema de defensa muy eficiente, formado por una gran variedad de componentes (Rahman, 2007), de los cuales el más importante es la alicina, considerada la molécula de defensa del ajo, que posee un amplio espectro de actividades biológicas. Este compuesto se produce cuando el ajo es aplastado, triturado o molido, desde la forma no proteínogénica aminoácida aliina (S- alilcisteína sulfóxido) en una reacción que se cataliza por la enzima alinasa. Esta reacción es esencial para desempeñar su función biológica.

De acuerdo con las últimas revisiones bibliográficas, la alicina es considerada un prooxidante modulador de las reacciones redox, transmitiendo su señal redox mediante la oxidación, por ejemplo, a través de la modificación de cisteína proteasas. Como sabemos, las especies de oxígeno reactivas (RSS) reaccionan químicamente con las moléculas que contienen oxígeno dando lugar a daños sobre macromoléculas biológicas como los lípidos, proteínas y DNA, en respuesta a esto, las células desarrollan un esquema protector basado en antioxidantes endógenos, la alicina hace que disminuyan estas especies de oxígeno siendo capaz de regular determinados procesos de detoxificación de enzimas como por ejemplo la tioredoxina reductasa, la hemo-oxigenasa 1 y la L- cisteína glutamato ligasa, mientras que bloquea la ruta de activación dependiente de ROS, se ha visto, así mismo, como inhibe la formación de radicales OH ya que interacciona de manera muy rápida con otras moléculas que contienen grupos tiol como la L-cisteína y el glutatión atravesando la membrana celular, como resultado se forman nuevos metabolitos que sirven de mediadores que prolongan la actividad antioxidante de la alicina, favoreciendo el aumento de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Jacob, 2014; Trio y col., 2014). Además esta sustancia es inhibidora de las acetil-CoA sintetasas presentes en mamíferos, plantas y levaduras, el sistema que se encarga de conformar el acetil-CoA bacteriano formado por una acetato quinasa y una fosfo-trans-acetilasa queda inhibido por la alicina, este sistema es específico para las enzimas que se encargan de la secuencia de la síntesis de ácidos grasos (Focke y col., 1990). La alicina reacciona muy rápidamente con los grupos tiol libres, mediante el intercambio tiol-disulfuro, de ahí que se piense que su principal mecanismo antimicrobiano es la interacción con enzimas que contienen este grupo tiol, incluyendo cisteína proteasas y alcohol deshidrogenasas (Ankri y col., 1997; Rabinkov y col., 1998).

La alicina, de una manera dosis-dependiente, es capaz de inhibir la proliferación de células bacterianas o fúngicas, incluyendo cepas resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus*. Además, en líneas celulares de mamíferos, incluidas células cancerígenas, produce la muerte celular e inhibe la proliferación celular. En concentraciones

menos letales, tiene una gran variedad de propiedades que promueven la salud relacionadas con el sistema cardiovascular. En definitiva, se puede afirmar que la alicina es un compuesto activo con propiedades muy beneficiosas que derivan directamente de la química molecular de la misma (Borlinghaus y col., 2014). La alicina tiene una serie de propiedades antifúngicas, tanto cuando se emplea de manera individual, como cuando se emplea acompañada de medicamentos antifúngicos (Kim y col., 2012a) y es efectiva frente a virus tales como el de la gripe en sus múltiples mutaciones (Chang y Cheong, 2008). La actividad antifúngica del ajo fue establecida originariamente en 1936 por Schmidt y Marquardt mientras trabajaban con cultivos de hongos del género *Epydermophyton*.

Además de las propiedades antimicrobianas que se le atribuyen al ajo y sus derivados, estudios llevados a cabo por Gorinstein y col. (2005) y Kim y col. (2009) evidencian propiedades antioxidantes en pollos broiler y gallinas ponedoras. Otros efectos beneficiosos se refieren a descensos en los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, previniendo la aterosclerosis por su habilidad antitrombótica, antiplaquetaria, disminución de la tensión arterial y control de la lipidemia (Ali y col., 2000; Tattelman, 2005; Amagase, 2006; Rahman y Lowe, 2006; Corzo-Martinez y col., 2007; Rahman, 2007). Finalmente, el consumo de ajo también se relaciona con la reducción del riesgo de padecer cáncer, y sus extractos y componentes efectivamente bloquean de manera experimental tumores inducidos en una amplia variedad de lugares del organismo tales como la piel, el pecho, el cérvix uterino y el colon (Hussain y col, 1990; Milner, 1996; Milner, 2001).

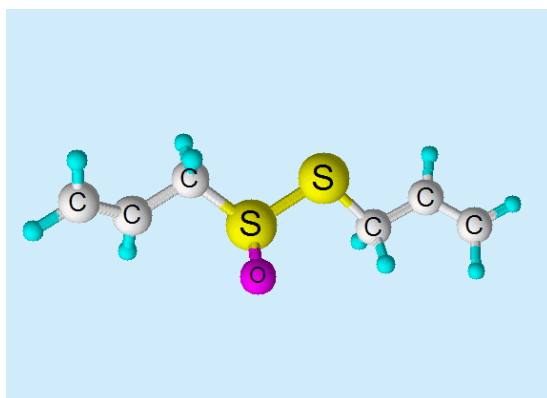


Figura 2.15. Estructura química de la alicina (Adaptado de Ruiz y col., 2010)

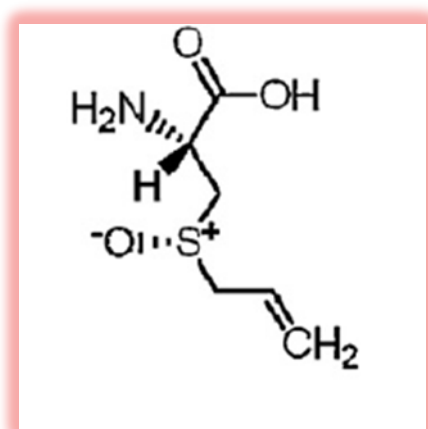


Figura 2.16. Estructura química de la aliina (Ruiz y col., 2010)

2.8.4. El ajo y sus derivados como agentes antimicrobianos

Los informes acerca del uso del ajo como agente antimicrobiano se remontan al famoso investigador Louis Pasteur (1858) y a la Primera Guerra Mundial, durante la cual se emplearon extractos de ajo por sus propiedades antibacterianas y antisépticas para prevenir la gangrena, entre otras enfermedades. A lo largo de la historia se han publicado numerosos estudios científicos que se interesaban por dichas propiedades (Koch y Lawson, 1996).

De acuerdo con Small y col. (1947), la alicina es el prototipo de los tiosulfinatos presentes en el ajo. El efecto se incrementa a medida que aumentamos la cadena de carbono del compuesto como es el caso del derivado n-propil tiosulfinato, que en un rango de 10 a 600 μM de compuesto frente a diferentes aislados bacterianos, es más potente que el derivado isopropil tiosulfinato, que necesita el doble de concentración para ejercer el mismo efecto bacteriostático. Dependiendo del organismo a estudiar y el antibiótico usado, la efectividad de antibióticos convencionales tales como los betalactámicos (penicilina y derivados como ampicilina) o los antibióticos glicosídicos como kanamicina, es comparable a la de la alicina (Cavallito y Bailey, 1944; Curtis y col., 2004; Fujisawa y col., 2009). Sin embargo, comparada con la mayoría de los antibióticos, la alicina ha demostrado tener un espectro de acción mucho más amplio en cuanto a combatir microorganismos se refiere, siendo activa frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, hecho que no se da en el antibiótico penicilina (Cavallito y col., 1945). La alicina también es activa frente a patógenos humanos que presentan resistencias antibióticas muy marcadas como es el caso del *Staphylococcus aureus*, bacteria resistente a la metilina y el gran causante de muchas de las infecciones hospitalarias. Se ha demostrado como la alicina es responsable de inhibir esta resistencia (Cutler y Wilson, 2004). En el caso de *Helicobacter pylori*, bacteria considerada una de las principales causas de úlceras gástricas y duodenales y también de cáncer gástrico, se ha visto como es sensible a la actuación de extractos de ajo, tanto en estudios realizados *in vitro* como *in vivo*, en concentraciones relativamente bajas, a pesar de que *H. pylori* es resistente a multitud de antibióticos (Rahman, 2007).

La alicina posee un particular mecanismo antimicrobiano.⁵ Para que un compuesto pueda tener actividad antimicrobiana tiene que ser capaz de alcanzar sus dianas potenciales, y a veces, esto supone penetrar en la célula microbiana. En las bacterias, un antibiótico tiene que superar las barreras físicas de la pared celular y de la membrana celular, además de otras añadidas según el tipo de bacteria (De Lancey Pulcini, 2001). La diana de ataque es muy importante ya que actuando sobre ella el antibiótico debe ser capaz de inactivar la célula o provocar la muerte celular. Miron y col. (2000) estudiaron la permeabilidad de membranas fosfolipídicas naturales y artificiales a la alicina y demostraron que ésta era capaz de difundir rápidamente por ellas.

Además de la alicina existen ciertos derivados industriales del ajo, los llamados organosulfurados, tales como PTS y PTS-O (Propil Propano Tiosulfinato y Propil Propano Tiosulfonato) que se obtienen mediante la descomposición de los componentes inicialmente presentes en los dientes de ajo como aliina y alicina y que han demostrado tener un notable

⁵ Ver arriba mecanismo de acción de la alicina, pág 80

efecto antimicrobiano (Ruiz y col., 2010). Estos compuestos han sido objeto de estudio en esta tesis doctoral.

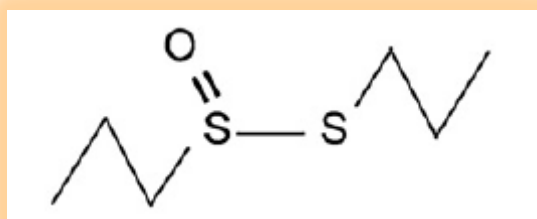


Figura 2.17. Estructura química del PTS (Ruiz y col., 2010)

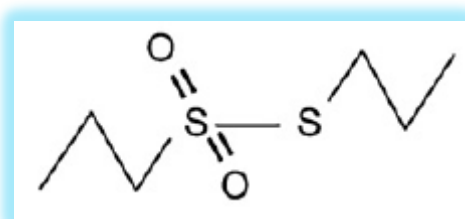


Figura 2.18. Estructura química del PTS-O (Ruiz y col., 2010)

2.8.5. Estudios *in vitro* con ajo y sus derivados

La actividad antibacteriana de la alicina ha quedado demostrada de manera consistente, por una serie de estudios *in vitro*. Cavallito y Baley (1944), comprobaron como la alicina pura extraída del ajo, en una concentración de 80 μM , era capaz de inhibir por completo el crecimiento de *Bacillus* spp, *Streptococcus* spp, *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhimurium* en un cultivo líquido. Cuando se testa alicina de origen sintético en concentraciones que abarcan de los 30 a los 200 μM , según Small y col. (1947) se consigue inhibir el crecimiento de *Bacillus* spp y *Streptococcus* spp en un cultivo líquido. En el estudio llevado a cabo por Curtis y col. (2004), el extracto de ajo demuestra inhibir el crecimiento de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* en una concentración de 1,72 μmol . En el caso de *E. coli* K12 una concentración de 0.52 a 1.72 μmol de extracto de ajo inhibe también el crecimiento. Fujisawa y col. (2009) realizan un estudio en el que comprueban la actividad antimicrobiana de la alicina de origen sintético contra la forma sensible a la meticilina de *Staphylococcus aureus*, impidiendo este compuesto algunas zonas de crecimiento de la bacteria y en una concentración de 0.0022 a 0.92 μmol . En cuanto a la forma resistente a la meticilina de *Staphylococcus aureus*, Cutler y Wilson (2004) demuestran cómo el extracto de ajo, en concentraciones que abarcan de 0.04 a 0,62 μMol , incapacita ciertas zonas del crecimiento de esta bacteria. Finalmente Feldberg y Chang (1988) comprueban cómo la alicina enzimáticamente sintetizada de la aliina en un rango de concentraciones de 200-500 μM frena por completo el crecimiento en medio líquido de *Salmonella typhimurium*. En relación con el efecto de la alicina sobre la síntesis de DNA, RNA y proteínas en *Salmonella typhimurium*, Feldberg y Chang (1988) concluyen que, efectivamente,

afecta a esta síntesis cuando se administra el compuesto en una concentración mínima de 0.3 mM.

En un estudio *in vitro* con cepas bacterianas aisladas de pacientes humanos realizado por Melvin y col. (2009), se demostró una excelente actividad antibacteriana a todas las concentraciones estudiadas (1000, 1500 y 2000 ppm), y su actividad fue directamente proporcional a la concentración testada. En una concentración de 2000 ppm, el aislado de *Proteus vulgaris*, seguido de *Morganella morgani* y *Escherichia coli* fue el más susceptible a la acción del extracto de ajo, mientras que en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, este extracto no mostró actividad ninguna. *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella Pneumoniae* y *Candida albicans* sí fueron moderadamente sensibles a la actividad antibacteriana del extracto en todas las concentraciones estudiadas. Otros autores también han demostrado el efecto inhibitorio del crecimiento y efecto letal que posee la alicina procedente de un extracto de ajo. Es el caso de Bakri y Douglas (2005), quienes demostraron la efectividad de este compuesto en bacterias orales, incluyendo 13 bacterias Gram positivas, 6 Gram negativas y 1 tipo de hongo. Más recientemente, Kallel y col. (2014), han demostrado *in vitro*, la actividad antimicrobiana que poseen los extractos de piel de ajo, inhibiendo el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* a la dosis más alta testada (10 mg/ml).

En el caso de compuestos organosulfurados derivados de la alicina, Ruiz y col. (2010) demostraron que el propil propano tiosulfinato (PTS) y el propil propano tiosulfonato (PTS-O) presentaban actividad antimicrobiana frente a todos los grupos de bacterias estudiadas *in vitro* y aisladas de heces de cerdo. En el caso de PTS-O, clostridios y bacteroides desaparecen en la presencia de 200 ppm del compuesto. Los grupos bacterianos más sensibles a la acción de ambos compuestos fueron los pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* y los coliformes. Por otro lado, los grupos de lactobacilos y bifidobacterias fueron más resistentes a la actuación de PTS y PTS-O. Cuando se añade el compuesto PTS, a mayor concentración del compuesto, mayor disminución de las poblaciones bacterianas, especialmente en el caso de enterobacterias y coliformes. Incluyendo PTS en dosis de 200-400 ppm se observó que la mitad de la población bacteriana desaparecía en los grupos de *Lactobacillus spp* y bifidobacterias. El grupo de bacterias anaerobias totales experimentó una disminución en sus poblaciones conforme se iba aumentando la dosis del compuesto. Cuando se adiciona el compuesto PTS-O, en el caso de enterobacterias y coliformes, las poblaciones son indetectables al administrar dosis del compuesto por encima de 200ppm; por otra parte, se observó una disminución muy acusada de lactobacilos y bifidobacterias en dosis iguales o superiores a 200 ppm del compuesto, no viéndose diferencias significativas con la dosis máxima de 400 ppm. De manera similar ocurrió en el caso de bacteroides, bacterias pertenecientes al género *Clostridium* y aerobias totales, las cuales disminuyeron con la actuación de PTS-O a 50-200 ppm, mientras que la dosis de 400 ppm aniquiló más de la mitad del grupo. El grupo de las bacterias anaerobias totales se mostró más sensible si cabe, disminuyeron muy significativamente su número en presencia de 200 ppm de PTS-O. Además, en especies bacterianas concretas como *E. coli* y *S. Typhimurium* se observó cómo su supervivencia se veía seriamente comprometida en presencia del compuesto PTS-O, mientras que PTS tuvo un mayor efecto contra *E. coli* si se compara con *S. typhimurium* (Ruiz y col., 2010).

2.8.6. Estudios *in vivo* con ajo y sus derivados

Siguiendo a Tattelman (2005), puede decirse que el ajo ha sido estudiado de manera amplia en estudios *in vivo* con animales y en ensayos clínicos con humanos, además de en evaluaciones epidemiológicas debido a sus múltiples propiedades medicinales. Así, en humanos se han realizado numerosos estudios que demuestran la gran influencia que la inclusión del ajo y sus derivados en la dieta tienen en ciertas enfermedades como el cáncer. Por ejemplo, el análisis de los datos obtenidos de siete conjuntos poblacionales que consumieron ajo, ha demostrado que a mayor cantidad de ajo ingerida en la dieta, menor riesgo de padecer cáncer de estómago, esófago, páncreas y colon (Tanaka y col., 2004; Chan y col., 2005; González y col., 2006). En otras enfermedades que también preocupan en grado sumo como la diabetes, se ha visto que cantidades moderadas de ajo incluidas en la dieta pueden ayudar a regular los niveles de glucosa en sangre y potencialmente disminuir las complicaciones derivadas de la enfermedad, como pueden ser las infecciones (Kook y col., 2009). Con respecto a enfermedades derivadas de la hiperlipidemia en sangre, es de destacar el estudio llevado a cabo por Durak y col. (2004), en el que se desarrollaron una serie de ensayos controlados en adultos sanos a los que se les administraban suplementos de ajo acompañados de dietas ricas en colesterol, demostrando que el ajo reducía los niveles de colesterol sérico y aumentaba la actividad fibrinolítica.

En terneros, la administración en la dieta de extracto de ajo en cantidades de 250 mg/Kg d peso y día supuso un aumento en la ganancia de peso y la ingesta alimentaria (Ghosh y col., 2011) además de una disminución en el recuento de coliformes en las heces con respecto al grupo control (Ghosh y col., 2010). En animales monogástricos, como el cerdo, el componente volátil del ajo, alil metil sulfóxido, ha inhibido la actividad bacteriana de un patógeno muy común en estos animales *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que llevó a su vez a mejorar los síntomas en dicha patología (Becker y col., 2012). Tatara y col. (2008) mostraron en sus ensayos con cerdos destetados que el extracto de ajo envejecido incluido en niveles de 1-2ml/kg de peso y día en la dieta mejoró el peso final y las propiedades morfológicas de las vellosidades del intestino. De acuerdo con Yan y col. (2013), el polvo de ajo fermentado a una dosis de 0,5 g/kg puede mejorar la ganancia de peso diaria y la ingesta, también es capaz de incrementar la digestibilidad de nutrientes y disminuir la concentración de *E. coli* detectada en muestras fecales de cerdos destetados; en cerditos en crecimiento los resultados son similares con una dosis de 2g/Kg ya que se comprobó que podía incrementar la ganancia de peso e ingesta diarias al aplicar el tratamiento durante unas seis semanas (Yan y col., 2011). Yan y col. (2012) mostraron como la administración de este mismo suplemento a niveles de 2 o 4 g/kg mejoró el rendimiento productivo y la digestibilidad de nutrientes en cerdos de esa edad. En este sentido, Wang y col. (2011a), probaron que *E.coli* se reducía considerablemente en cantidades crecientes de ajo fermentado incluido en las dietas de cerditos en crecimiento y la adición de ajo a la dieta en niveles de 1-10 g/kg consiguió la disminución de la ingesta alimentaria y mejoró el índice de transformación (Cullen y col., 2005).

Los estudios acerca del efecto del ajo o sus derivados sobre la microbiota intestinal en pollos se remontan décadas atrás. Es el caso del estudio realizado por Sharma y col. (1977), en el cual se demuestran las propiedades antibacterianas de extractos de ajo en el agua a la hora de inhibir bacterias de tipo Gram positivo y de tipo Gram negativo en el GIT de pollitos;

también consiguió inhibir el crecimiento de bacterias que presentan cierta resistencia a algunos de los antibióticos más empleados. Sarica y col. (2005) demostraron que la suplementación con ajo disminuía la población de coliformes considerados patógenos en el intestino de pollos broiler. En un estudio llevado a cabo por Ramiah y col. (2014), se comprobó como la administración de ajo en polvo en broilers aumentó la ganancia de peso, el peso total y la ingesta alimentaria de los mismos en las últimas semanas de vida. En este mismo experimento se observó una disminución en el recuento de *E. coli* y un aumento en el de *Lactobacillus spp* en el GIT de los pollitos con 42 días de edad. Jimoh y col. (2014) señalan que existe un efecto positivo de la administración de ajo en polvo en las dietas para broilers con respecto al índice de transformación.

Evidentemente, la mayoría de estas actividades biológicas no han sido adecuadamente adscritas a algún compuesto(s) concreto(s) y bien definido. En el presente trabajo hemos centrado nuestra atención sobre el uso de dos derivados industriales organosulfurados (PTS, PTS-O) como agentes antibacterianos en broilers. Hemos estudiado por tanto su efecto sobre la microbiota digestiva habitual de las aves, tanto saprofita como patógena o potencialmente patógena. En un segundo momento, hemos tratado de relacionar este efecto modulador de la microbiota con los índices productivos más relevantes en producción aviar.

Capítulo 3: Metodología y Resultados.

Breve aclaración

Los materiales y métodos utilizados para la realización de esta Tesis Doctoral quedan claramente explicados en los puntos 2.3 y 2.6.4. de la Revisión Bibliográfica, y específicamente descritos en las tres publicaciones que se exponen a continuación y que avalan esta tesis, por lo que no hemos considerado necesaria su descripción de forma independiente. Incorporamos a continuación las publicaciones que constituyen la base a esta memoria de Tesis Doctoral.

3.1.

Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*

M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri,
and L. A. Rubio

***Poultry Science*, 2012, 91 (9), 2148-2157
doi:10.3382/ps.2012-02280**

POULTRY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Oxford Journals

Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*

M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, and L. A. Rubio



Poultry Science, 2012, 91 (9), 2148-2157

doi:10.3382/ps.2012-02280

Received March 6, 2012.

Accepted May 6, 2012.

ABSTRACT

Two experiments were carried out to study the effects of dietary supplementation with the garlic (*Allium sativum*)-derived product propyl propane thiosulfonate (PTS-O) on the intestinal log₁₀ number of copies of enteropathogens in broiler chickens, together with their intestinal morphology and growth performance. The additive had no significant effect on feed intake at any dose assayed. In experiment 1 (1 to 21 d of age), the BW of chickens fed on 45 mg of PTS-O/kg of diet was higher ($P < 0.01$) than that of controls. Birds fed on diets containing 45 and 90 mg of PTS-O/kg of diet had improved ($P < 0.01$) feed:gain ratios compared with the controls at 21 d of age. Ileal villus height, width and surface area, mucosal thickness, and muscular layer thickness were considerably greater ($P < 0.01$) than control values in chickens fed 90 mg of PTS-O/kg of diet. The *Clostridium perfringens* log₁₀ number of counts was not significantly affected at any dose assayed. The inclusion of PTS-O at both concentrations (45 and 90 mg/kg of diet) resulted in lower ($P < 0.01$) log₁₀ number of copies of ileal *Salmonella* spp. and crop enterobacteria and *Escherichia coli*. The inclusion of 90 mg of PTS-O/kg of diet also resulted in lower ($P < 0.01$) enterobacteria and *E. coli* log₁₀ numbers of copies in the ileal and cecal contents, respectively. The number of copies of *Campylobacter jejuni* was not significantly affected. In experiment 2 (15 to 28 d of age), lower ($P < 0.01$) log₁₀ number of copies of *Salmonella* spp. and *C. jejuni* were determined in the ileal contents of chickens fed on diets containing 135 mg of PTS-O/kg of diet. The addition of 90 mg of PTS-O/kg of diet lowered ($P < 0.01$) only the number of copies of ileal *Salmonella* spp. This investigation confirmed previous in vitro data and showed that PTS-O lowered the intestinal numbers of enteropathogens and improved the ileal histological structure and productive parameters of broilers.

Keywords: garlic derivative; *Salmonella* subspecies; *Campylobacter jejuni*; *Clostridium perfringens*; intestinal histological structure

INTRODUCTION

The intestinal flora of broiler chickens plays an important role in growth performance and health of birds (Bjerrum et al., 2006), and its influence is particularly relevant when chickens are young and their microbiota is still in the process of development (Gong et al., 2008). The gastrointestinal tract of chickens on hatching is not well adapted to the digestion and absorption of many feed components (Sell, 1996; Uni et al., 1999). Hence, the interaction of intestinal growth, digestive functions, and diet is critical during the posthatching period when birds switch to enteral nutrition (Uni et al., 1999).

Several enteric pathogens associated with the intestinal microbiota of broilers are known to cause millions of losses to the sector in addition to human and animal health problems. In particular, enterobacteria, and more specifically *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp., are not only widespread pathogens in the food industry, but also have been frequently identified as the etiological agents of food-borne outbreaks (Eeckhaut et al., 2008). Zhao et al. (2001) reported the occurrence of 1.4 million cases of human salmonellosis every year in the United States alone. At the end of 2003, the EU issued a regulation

(Commission of the European Communities. No. 2160/2003) relating to salmonellosis and other food-borne zoonoses, obliging member states to undertake certain measures to monitor and reduce the risk of transmission of *Salmonella* spp. According to the Centers for Disease Control and Prevention, there are approximately 2.4 million cases of human campylobacteriosis infection each year in the United States. The commonest causes of these illnesses are the handling of raw poultry meat and the consumption of undercooked poultry and poultry products (Mead et al., 1999; CDC, 2008).

Antibiotic growth promoters (AGP) have been used as broiler feed additives for years to prevent disease and improve performance efficiency (Dibner and Richards, 2005). However, due to the emergence of microbes resistant to the antibiotics used in therapy, in January 2006, the European Commission (EC) banned the use of AGP in animal production (EC Regulation No. 1831/2003; <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>). Since this ban it has become necessary to search for natural alternatives with effects similar to AGP but without their reported drawbacks. Some plant extracts have shown potential to modulate the intestinal microflora and improve the performance efficiency of broilers (Cross et al., 2011). Garlic (*Allium sativum*) has been used for centuries for its health-giving properties, and garlic and garlic products have shown a broad antibiotic spectrum against both gram-positive and gram-negative bacteria (Harris et al., 2001). In addition, they have been found to be effective against many common pathogenic intestinal bacteria responsible for diarrhea in humans and animals (Amagase et al., 2001; Tatara et al., 2008). Garlic-derived products have been reported to be effective even against those strains that have become resistant to antibiotics; in particular, garlic extract and allicin have been shown to exert bacteriostatic effects on some vancomycin-resistant enterococci (Harris et al., 2001). Due to their antimicrobial activity, garlic-derived compounds might represent a useful alternative to AGP.

The antimicrobial effects of organosulphurate compounds industrially obtained by decomposition of initial compounds naturally present in garlic have been previously described by Ruiz et al. (2010) *in vitro*. These compounds showed antimicrobial activity against every bacterial group in pig feces studied, although enterobacteria and coliforms were the most affected populations. Furthermore, these products exerted a bactericidal effect against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* strains. Nevertheless, there is no information in the literature concerning the use of these compounds on the intestinal microbiota of poultry. Accordingly, the aim of the present study was to investigate the antimicrobial effects of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) dietary supplementation *in vivo*, particularly against three of the main enteropathogens linked to poultry production, namely *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens*. Finally, because a connection has been reported between growth performance, gut morphology, and decrease of pathogen populations by using other feed additives (Yang et al., 2008; Baurhoo et al., 2009), these parameters were also studied in the current experiments.

MATERIALS AND METHODS

Dietary Supplements

Proallium-SO-DMC was the commercial preparation used in this study. This product was provided by DMC Research Center S.L. (Granada, Spain). It contained 11.3% of the active compound PTS-O as determined by HPLC according to the procedure described by Iberl et al. (1990). The PTS-O was incorporated in an inert commercial alimentary support (cyclodextrin) to produce Proallium-SO-DMC (Ruiz et al., 2010).

Birds, Diets, and Housing

The experimental protocol was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Spanish Council for Scientific Research (Madrid, Spain), and the animals were cared for in accordance with the Spanish Ministry of Agriculture guidelines (RD 1201/2005).

Experiment 1.

A total of 144 male one-day-old Cobb broiler chickens were randomly assigned to 1 of 3 dietary treatments. Each treatment involved 8 replicates with 6 birds each. Birds were weighed on arrival and raised in heated wire-floored batteries, and received a lighting regimen of 23L: 1D. Balanced commercial diets (Table 1) free of any feed antibiotics, and formulated to match the requirements for growing birds of this age and genotype, were used. Diets were fed ad libitum for 21 d. The dietary treatments were control (commercial diet with no additive), and PTS-O-45 and PTS-O-90 (commercial diet supplemented with 45 and 90 mg of PTS-O/kg of diet, respectively). The doses of PTS-O used were chosen according to results previously found in vitro (Ruiz et al., 2010). The aim of this experiment was to study the effect of dietary PTS-O addition on the pathogen (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens*) or potential pathogen (enterobacteria, *E. coli*) intestinal bacterial numbers, together with the ileal histological structure and productive parameters of broilers.

Table 1

Composition (g/kg) of the diet used in both experiments

Item	Value
Component	
Maize	462
Soy flour	310
Wheat	150
Vitamin + mineral mix ¹	30
Animal fat	20
Calcium carbonate	16.0

Item	Value
Calcium phosphate	3.1
Sodium chloride	4.5
Chromium oxide	2.0
Methionine	2.2
Lysine	0.2
Calculated composition	
ME (cal/g)	2,912
CP	193.0
Crude fiber	33.7
Fat	44.6
Calcium	7.1
Phosphorous	6.2
Methionine + cysteine	8.6
Lysine	1.2

¹The mineral-vitamin mix contained (per 30 kg): vitamin A, 7,500,000 IU; vitamin D₃, 1,500,000 IU; vitamin E, 25 g; vitamin B₂, 2 g; vitamin B₁₂, 10 mg; vitamin B₆, 67 mg; calcium pantothenate, 7.5 g; nicotinic acid, 10 g; folic acid, 25 mg; vitamin K₃, 1 g; choline chloride, 250 g; Fe, 4 g; Cu, 750 mg; Co, 50 mg; Zn, 38 g; Mn, 42 g; I, 680 mg; Se, 45 mg; coccidiostat (nistatin + nicarbacin), 0.50 kg; BHT, 250 mg.

Experiment 2.

A total of 30 male 15-d-old Cobb broiler chickens were purchased from a local farm. The chickens were randomly assigned to 1 of 3 dietary treatments. Treatments involved 2 replicates with 5 birds each. The birds were weighed on arrival and placed in heated wire-floored batteries. They were fed ad libitum for 14 d and received a lighting regimen of 23L:1D. Dietary treatments were control (no additive), and PTS-O-90 and PTS-O-135 (commercial diet supplemented with 90 and 135 mg of PTS-O/kg of diet, respectively). The PTS-O-90 was found to be the most effective in experiment 1 (90 mg/kg), and PTS-O-135 was assayed to determine if a higher dose would be more effective or not. This experiment was also run to check if the results obtained in experiment 1 on pathogen bacteria would be repeated in conditions closer to practical broiler production. Accordingly, the birds were bought in this case from a local producer at 15 d of age so that their initial “natural” intestinal microbiota was already established, and its composition was as close as possible to that in practical rearing conditions.

Euthanasia and Sample Collection

Data on live BW and feed intake (**FI**) were recorded at the beginning and end of both experiments. These data were used to calculate final BW, FI, and feed:gain ratio (**F/G**).

Experiment 1.

At 21 d of age, 3 birds per replicate (i.e., 18 per treatment) were randomly selected and killed by intra-thoracic injection of 0.2 mL/bird of the euthanasic T-61 (Intervet, Salamanca, Spain). The pH of the crop content of each bird was immediately measured with a Crison pH meter (Crison Instruments, S.A, Alella, Spain). Immediately afterward, samples from the crop, ileal (considered as the section between the Meckel's diverticulum and the ileo-cecal junction), and cecal contents of each bird were collected in plastic tubes, stored at -20°C , and freeze-dried (Ruiz and Rubio, 2009). Samples of about 1 cm taken at the mid-point of the ileum of 3 birds fed on the control or experimental diets were removed for histological analysis. Only samples from the chickens fed on the control or PTS-O-90 diets were subjected to histological analysis because there was a more pronounced effect on the number of enteropathogen copies in these chickens than there was in those fed PTS-O-45. The samples were flushed twice with PBS to remove luminal digesta and immersed in formalin (10% neutral buffered formaldehyde) for fixation. After 24 h in 10% neutral buffered formaldehyde, the tissue samples were carefully cleaned of any remaining digesta with deionized water, and then transferred to a fresh solution of 10% neutral buffered formaldehyde (Sigma, Alcobendas, Spain).

Experiment 2.

At 28 d of age, 10 birds ($n = 10$ per treatment) were weighed and killed by intra-thoracic injection of 0.2 mL/bird of the euthanasic T-61 (Intervet, Salamanca, Spain). For the microbiota analysis, the ileal content of each bird was collected into a plastic tube, stored at -20°C , and freeze-dried (Ruiz and Rubio, 2009).

Real-Time PCR Analysis

Samples for microbial analysis were transferred into 2-mL bead beater vials containing 3 zirconia beads and reduced by physical disruption for 1 min in a Mini-Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, UK) to small particles to facilitate DNA extraction. Total DNA was isolated from freeze-dried intestinal content samples (40 mg) using the QIAamp DNA stool kit (Qiagen, West Sussex, UK) according to the manufacturer's instructions except that to increase its effectiveness the lysis temperature was raised to 95°C , and an additional step with lysozyme (10 mg/mL, 37°C , 30 min) incubation was included. Eluted DNA was treated with RNase and its concentration assessed spectrophotometrically with a NanoDrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Purified DNA samples were stored at -20°C until use.

Bacterial numbers in intestinal samples were determined in duplicate by quantitative PCR (**q-PCR**) assays conducted in 96-well polypropylene plates using an iQ5 Cycler Multicolor PCR detection system (BioRad Laboratories, Hercules, CA). The 16S rRNA gene-targeted primers used are shown in Table 2. The composition of the reaction mixture and PCR conditions were those described in the quoted references. A plasmid standard containing the target region was generated using DNA extracted from pooled fecal samples of rats fed an AIN-93G diet. The amplified product was run on a 2% agarose gel, purified with an MBL-Agarose

QuickClean kit (Dominion MBL, Spain), cloned using the TOPOTA cloning kit (Invitrogen, Paisley, UK), and transformed into *Escherichia coli* One Shot Top 10 cells (Invitrogen). Plasmids were eluted and the sequences obtained by the sequencing service of the Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC, Granada, Spain), before being submitted to the ribosomal RNA database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) to confirm the suitability of the primers. The concentration of the resulting products was determined spectrophotometrically and copy numbers calculated in terms of product size. For quantification of target DNA copy number a standard curve was generated with serial 10-fold dilutions of the extracted product, using at least 6 nonzero standard concentrations per assay. The bacterial concentration in each sample was measured as log₁₀ copy number by interpolating the C_t values obtained from the fecal samples into the standard calibration curves. Each plate included duplicate reactions per DNA sample and the appropriate set of standards.

Table 2

Sequences of the primers used for the quantitative determination of microbial groups in the intestines of the broiler chickens in both experiments

Bacterial group	Primer	Reference
<i>Clostridium perfringens</i>	F: (ATGCAAGTCGAGCGAGTG) R: (TATGCGGTATTAATCTCTCCTTT)	Rinttilä et al., 2004
<i>Campylobacter jejuni</i>	VS15: (GAATGAAATTTTAGAATGGGG) VS16: (GATATGTATGATTTTATCCTGC)	Yang et al., 2004
<i>Salmonella</i> spp.	invA-1: (TTGTTACGGCTATTTTGACCA) invA-2: (CTGACTGCTACCTTGCTGATG)	Cortez et al., 2006
Enterobacteria	F5 (ATGGCTGTCGTCAGCTCGT) R5 (CCTACTTCTTTTGCAACCCACTC)	Castillo et al., 2006
<i>Escherichia coli</i>	F5 (GTTAATACCTTTGCTCATTGA) R5 (ACCAGGGTATCTAATCCTGTT)	Malinen et al., 2003

Histological Analysis

Fixed samples were dehydrated and embedded in paraffin wax. Three slides were prepared from each sample, and one containing a minimum of 2 sections cut at 4 µm, at least 50 µm apart. The slides were stained with hematoxylin and eosin. All measurements were made with a light microscope with the help of an image analysis system (Cell[^] Imagen Software, Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a monitor. Five well-oriented villi and crypts were selected on each slide to determine villus height and width, and crypt depth. The villus height was determined as the distance from the tip to the bottom of the villi, and crypt depth as the distance between its mouth and its base. Villus surface area was calculated as (3.1416 × villus width) × villus height. Mucosal thickness was determined as the distance between the mucosal epithelium and the muscular layer, and the muscularis as the inner circular and outer longitudinal layers of smooth-muscle cells (Rubio et al., 2010).

Statistical Analysis

Data were analyzed as a one-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2003), with the pen serving as the experimental unit for performance parameters, and the individual chicken as the experimental unit for histological and microbiological parameters. Treatment means were separated using Bonferroni's multiple comparison tests. Statistical significance was declared at a probability of $P < 0.05$. All microbiological counts were subject to base-10 logarithm transformation before analysis.

RESULTS

Performance and Crop pH Values

In experiment 1, BW of birds fed PTS-O-45 (Figure 1) was higher ($P < 0.05$) than that of controls at 21 d of age. No significant effect of diets was observed on FI, but F/G of birds fed diets PTS-O-45 and PTS-O-90 was significantly ($P < 0.05$) lower (better) than controls. Crop pH values were 5.87 ± 0.12 , 5.89 ± 0.11 , and 5.91 ± 0.10 for birds fed on the control, PTS-O-45, and PTS-O-90 diets, respectively. In experiment 2, no significant differences were found at 28 d of age between the controls and the PTS-O-fed birds in final BW ($1,044 \pm 68$, $1,091 \pm 181$, and $1,060 \pm 142$ g), FI ($6,912 \pm 116$, $6,663 \pm 116$, and $6,745 \pm 280$ g), or F/G (2.30 ± 0.03 , 2.12 ± 0.04 , and 2.17 ± 0.09) of birds fed on the control, PTS-O-90, and PTS-O-135 diets, respectively.

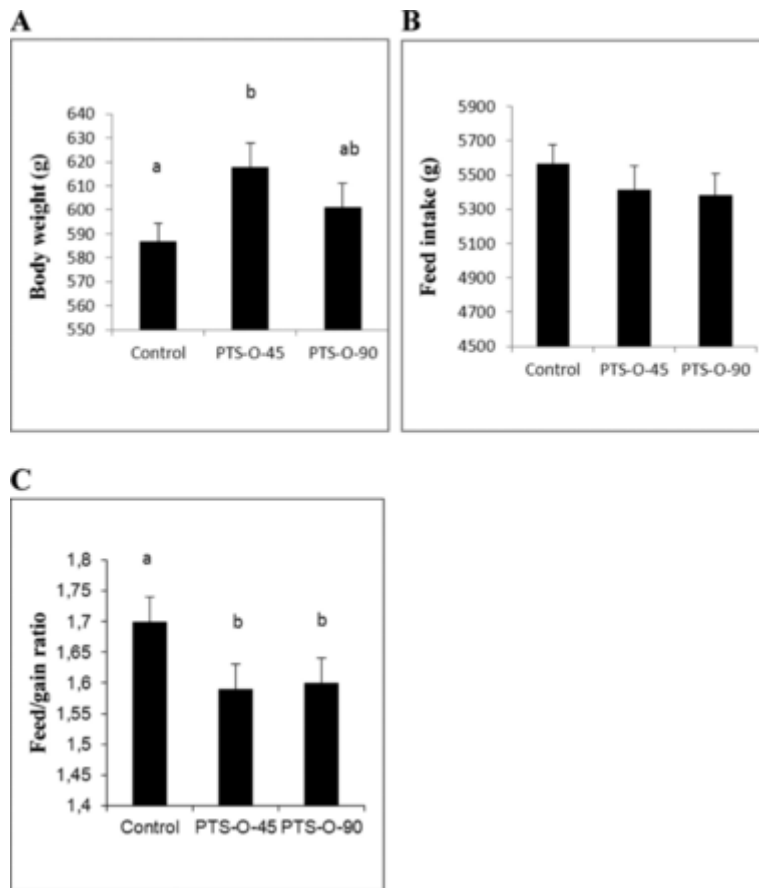


Figure 1

Effects of dietary inclusion of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) on final BW (A), feed intake (B), and feed:gain ratio (C) of chickens in experiment 1.

^{a,b}Bars with different letters were significantly different ($P < 0.01$). Values are means (8 replicates of 6 birds each) with their SD in bars.

Real-Time PCR Analysis

Experiment 1.

The pathogens here studied could not be properly quantified in the crop and cecal samples due to very low numbers. The results of pathogen quantification in the ileal contents are presented in Table 3. The PTS-O addition had no effect on the *C. perfringens* or *C. jejuni* \log_{10} number of copies, although a significant ($P < 0.01$) decrease in *Salmonella* spp. was determined in birds fed the PTS-O-90 diet. Among potentially pathogenic bacteria, significantly ($P < 0.01$) lower \log_{10} number of copies of enterobacteria and *E. coli* populations were found respect to controls in the crop of both PTS-O-fed groups (Table 4). Lower ($P < 0.01$) number of copies of enterobacteria and *E. coli* were respectively determined in the ileal and cecal contents of birds fed PTS-O-90 compared with the control group. No significant effect was observed with regard to enterobacteria and *E. coli* \log_{10} number of copies in birds fed PTS-O-45 in the ileum and ceca, respectively.

Table 3

Effect of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) dietary addition on the log₁₀ number of copies per milligram of intestinal content of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in the ilea of birds in experiment 1^{1,2}

Item	Control	PTS-O-45	PTS-O-90	Pooled SD
<i>Salmonella</i> spp.	3.48 ^a	3.48 ^a	2.77 ^b	0.49
<i>C. jejuni</i>	4.12	4.42	3.83	0.59
<i>C. perfringens</i>	2.93	3.32	3.03	0.31

^{a,b}Means with different superscripts in each row were significantly different ($P < 0.01$).

¹For details on the measurements and calculations of the different parameters, see Materials and Methods.

²Control = commercial diet with no additive; PTS-O-45 and PTS-O-90 = commercial diet supplemented with 45 and 90 mg of PTS-O, respectively.

Table 4

Effect of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) dietary addition on the log₁₀ number of copies per milligram of intestinal contents of enterobacteria and *Escherichia coli* in the crop, ileal, and cecal contents of birds in experiment 1^{1,2}

Item	Control	PTS-O-45	PTS-O-90	Pooled SD
Crop				
Enterobacteria	5.54 ^a	5.07 ^b	4.4 ^b	0.70
<i>E. coli</i>	5.48 ^a	4.79 ^b	4.02 ^b	0.81
Ileum				
Enterobacteria	4.41 ^a	4.14 ^a	3.59 ^b	0.60
<i>E. coli</i>	3.16	3.34	3.03	0.76
Ceca				
Enterobacteria	5.58	5.73	5.62	0.53
<i>E. coli</i>	5.90 ^a	5.84 ^a	5.41 ^b	0.63

^{a,b}Means with different superscripts in each row were significantly different ($P < 0.01$).

¹For details on the measurements and calculations of the different parameters, see Materials and Methods.

²Control = commercial diet with no additive; PTS-O-45 and PTS-O-90 = commercial diet supplemented with 45 and 90 mg of PTS-O, respectively.

Experiment 2.

Birds fed on PTS-O-135 had lower ($P < 0.01$) *Salmonella* spp. and *C. jejuni* number of copies than controls. The values for *C. jejuni* or *C. perfringens* number of copies, although numerically lower than controls, did not reach significant differences in birds fed the PTS-O-90 diet. No significant effect was observed in *C. perfringens* log₁₀ number of copies (Table 5) at any dose assayed.

Table 5

Effect of propyl propane thiosulfonate (PTS-O) on the ileal log₁₀ number of copies per milligram of intestinal content of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in the ileal content of birds in experiment 2^{1,2}

Item	Control	PTS-O-90	PTS-O-135	Pooled SD
<i>Salmonella</i> spp.	3.25 ^a	2.21 ^b	2.41 ^b	0.72
<i>C. jejuni</i>	2.61 ^a	2.14 ^{ab}	1.98 ^b	0.47
<i>C. perfringens</i>	4.82	4.45	4.61	0.63

^{a,b}Means (n = 10) with different superscripts in each row were significantly different ($P < 0.01$).

¹For details on measurements and calculations of the different parameters, see Materials and Methods.

²Control = commercial diet with no additive; PTS-O-45 and PTS-O-90 = commercial diet supplemented with 45 and 90 mg of PTS-O, respectively.

Morphology of the Ileal Mucosa

Crypt depth and the villus height/crypt depth ratio were not significantly influenced by supplementation with 90 mg of PTS-O/kg of diet (Table 6) in experiment 1. Significant differences in histometrical parameters of small intestinal samples were found, however, for villus height, villus width, villus surface area, mucosal thickness, and muscular layer thickness, which were all greater ($P < 0.01$) in birds fed the PTS-O-90 diet than in the controls (Table 6 and Figure 2).

Table 6

Morphology¹ of the ileal sections of 21-d-old broiler chickens fed on control or experimental (propyl propane thiosulfonate; PTS-O-90) diets in experiment 1

Item	Control	PTS-O-90	Pooled SD
Villus height, μm	785 ^a	937 ^b	89
Crypt depth, μm	96	105	15
Villus height/crypt depth	8.7	8.9	1.9
Villus width, μm	131 ^a	276 ^b	62
Villus surface area, μm^2	325,940 ^a	807,766 ^b	183,053

Item	Control	PTS-O-90	Pooled SD
Mucosal thickness, μm	47 ^a	66 ^b	16
Muscular layer thickness, μm	172 ^a	204 ^b	39

^{a,b} Means (n = 3, with 5 measurements per sample) with different superscripts in each row were significantly different ($P < 0.01$).

¹For details on measurements and calculations of the different parameters, see Materials and Methods.

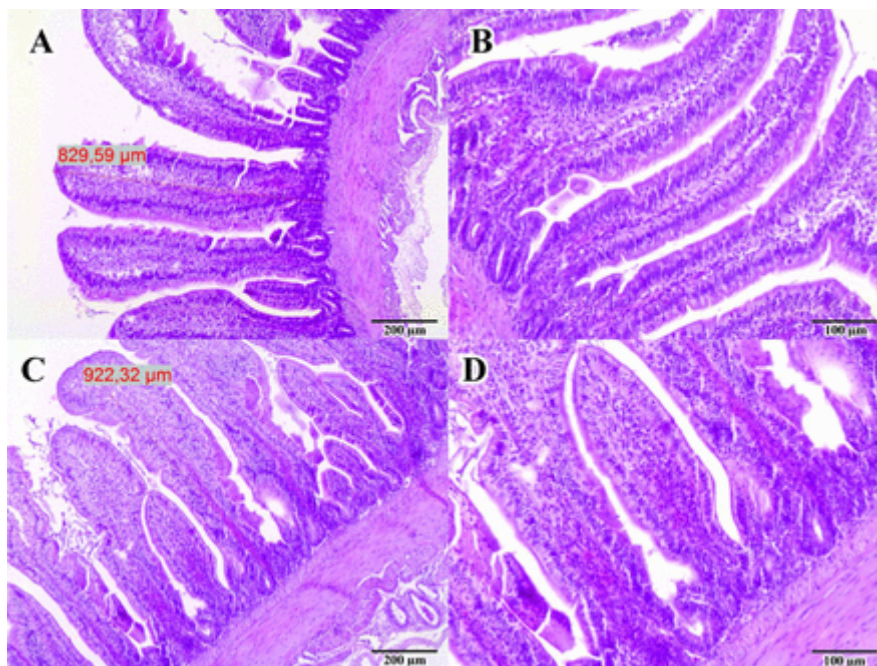


Figure 2

Light microscope photograph showing the histological structure of ileal sections of broiler chickens fed on the control (A and B) or propyl propane thiosulfonate (PTS-O-90; C and D) diets. Villi in PTS-O birds were taller and wider than those of controls. For specific measurements, see Table 6. Bars represent 200 (A and C) or 100 (B and D) μm .

DISCUSSION

Improving feed efficiency is a major factor in reducing the costs of poultry production (de Verdal et al., 2011). In the current experiments, we observed a significantly positive effect of dietary PTS-O addition on the productive parameters of broilers. Thus, F/G decreased for both PTS-O doses assayed in experiment 1 (Figure 1), and tended to be lower for the PTS-O fed birds in experiment 2. Our results are in line with those of Javandel et al. (2008), who reported that garlic meal at high doses led to lower feed conversion ratios in broilers, and Jagdish and Pandey (1994), who found similar effects in cockerels. In contrast, Choi et al. (2010) found no differences in F/G with different levels of garlic powder in chickens. Body weight increased

with respect to controls in birds fed PTS-O-35 in experiment 1, which is in agreement with data by Shi et al. (1999), who reported positive effects of garlic meal on weight gain in broilers, even though other authors (Dey and Samantha, 1993; Javandel et al., 2008; Choi et al., 2010) found no significant effect of garlic feeding on daily weight gain of broiler chickens. The PTS-O supplementation did not affect FI in any case in the current work, which agrees with the findings of some researchers (Horton et al., 1991; Choi et al., 2010), but not with those by others (Dey and Samantha, 1993; Shi et al., 1999; Javandel et al., 2008) working with garlic powder or garlic meal. These discrepancies may be due to a variety of reasons: i) differences in the actual products used (garlic meal, garlic powder, garlic derivatives, and so on); ii) the nature of the additive employed and the concentrations of active components, which differed considerably between experiments; iii) the complicated chemistry of garlic (see Amagase et al., 2001), and the quality of garlic products themselves, which depends very much on the manufacturing process; and iv) inconsistencies in the efficacy of garlic supplements, which may be due to incorrect standardization, overlooking of truly active compounds, and so on. The advantage of the results here reported mainly lies in the fact that a defined, stable, chemically well-characterized compound was used (Ruiz et al., 2010).

The proliferation of pathogens in the intestine often results in inflammatory responses that lead to productivity losses, increased mortality, and increased contamination of poultry products (Jalahtii and Kettunen, 2004; Baurhoo et al., 2009). In addition, it is well established that food safety is closely related to the prevention or elimination of pathogenic bacteria in food products (Loar et al., 2010). Among pathogens that inhabit the broiler intestine, *Salmonella* spp., *C. jejuni*, and *C. perfringens*, are among those with higher economic and health impact. *Clostridium perfringens*, a spore-forming gram-positive anaerobic bacterium that usually forms part of the normal microbiota of productive animals and birds, is known to be the major causative agent of necrotic enteritis in broiler chickens (Van Immerseel et al., 2004), a disease that has reemerged after the ban on the use of AGP in feed (Gholamiandehkordi et al., 2009). Poultry and poultry products are considered to be one of the most significant sources of *Campylobacter* spp. infections (Vellinga and VanLoock, 2002), and a plethora of different approaches have been examined over the past few years to reduce its prevalence in farms, including the use of bacteriocins (Line et al., 2008) and organic acids or their derivatives (Hilmarsen et al., 2006). Nevertheless, it has proved very difficult to find a single, adequate, practical intervention measure able to reduce the colonization of the broiler gut by *Campylobacter* spp. (Lin, 2009). Species belonging to enterobacteria such as *Salmonella* spp. are the main cause of food-borne gastroenteritis in humans. Indeed, chicks can easily be infected with enteric pathogens such as *Salmonella* spp. in the period between 0 and 21 d of age (Tanikawa et al., 2011). Finally, *E. coli* is a pathogen of particular interest to the broiler industry (Loar et al., 2010), and poultry litter, a potential reservoir and transmission vehicle for pathogens and potential pathogens, is a major source of this bacterium (Garrido et al., 2004; Schrader et al., 2004). In summary, gastrointestinal infections can be controlled to some extent by using antimicrobial agents in animals and birds, but as mentioned above, their use is severely dissuaded in many countries owing to the growing awareness of problems related to antimicrobial resistance (Eckhaut et al., 2008).

Garlic extracts have been reported to exert antimicrobial activity against these potentially pathogenic populations (Curtis et al., 2004). The antibacterial activity of garlic is widely attributed to its major thiosulfinate, allicin (Cavallito and Bailey, 1944; Ariga and Seki, 2006). Previous studies (Ross et al., 2001) have proved that garlic derivatives inhibit the growth of many enteric bacteria, including pathogenic bacteria. Indeed, allicin and garlic acid extracts have exhibited a wide spectrum of antibacterial activity, including *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium* spp. (Uchida et al., 1975; Cellini et al., 1996). Ruiz et al. (2010) demonstrated a bactericidal effect of PTS-O in vitro against enterobacteria, coliforms, *E. coli*, and *Salmonella* Typhimurium. Our present in vivo results are in accordance with those previous in vitro studies. The results of experiment 1 showed that different concentrations of PTS-O had a significant antimicrobial effect in vivo against *Salmonella* spp., *C. jejuni*, enterobacteria and *E. coli* populations. The effect is likely to be affected by dose because PTS-O-135 was more effective than PTS-O-90 (Table 5), which in turn was more effective than PTS-O-45 (Tables 3 and 4). The main antimicrobial effect of thiosulfates such as allicin has been reported to be due to their chemical reaction with thiol groups of various enzymes such as the acetyl-CoA-forming system, consisting of acetate kinase and phosphotransacetyl-CoA synthetase (Focke et al., 1990). The RNA polymerase might also be a target for allicin. Allicin at bacteriostatic concentrations inhibits RNA synthesis in *Salmonella* Typhimurium (Feldberg et al., 1988). In *E. coli* this same enzyme contains a single sulfhydryl group, which might react with allicin (Ozolin et al., 1990). The significance of allicin as a biological effector molecule is not only due to its high reactivity with low and high molecular weight thiols, but also to its accessibility, resulting from high membrane permeability (Miron et al., 2000). Finally, the number of *C. perfringens* copies was not affected by any dose of PTS-O assayed. The resistance of *C. perfringens* to antibiotics of different nature and mechanism of action, applied in both human and veterinary care, has previously been described (Martel et al., 2004; Slavić et al., 2011; Voidarou et al., 2011), but the precise mechanism behind this lack of effect is as yet unknown.

The gastrointestinal tract plays a vital role in the digestion and absorption of nutrients required for maintenance and growth. In the current study, PTS-O dietary supplementation improved intestinal histological structure. Similar effects have previously been reported with other additives, such as Cecropin hybrid (Wen and He, 2012), the bacteriocin Albusin B (Wang et al., 2011), and mannan oligosaccharides (Yang et al., 2008; Baurhoo et al., 2009). An increase in the efficiency of nutrients absorption and performance, associated with increased absorptive area of the gut and lower numbers of intestinal pathogens, may occur due to villi height increases (Stappenbeck et al., 2002; Baurhoo et al., 2009). It has also been shown that microorganisms can interact directly with the lining of the gastrointestinal tract (van Leeuwen et al., 2004). In our study, the morphological structure of the small intestine was affected in birds fed on PTS-O-90 (Table 6 and Figure 2). The height, width, and surface area of the villi, together with the thickness of the mucosa and the muscular layer thickness, all increased considerably compared with control values. It is known that a progressive increase both in absorptive area and in the mucosal capacity for hydrolysis occurs at early ages in poultry, and that FI, intestinal growth, and brush border enzyme development are finely controlled in young chickens to maintain an efficient nutrient supply (Uni et al., 1999). It is also accepted that a lower microbial proliferation in the gut reduces the competition for nutrients between

the host and its resident microbiota, and that this reduction in competition has been reported as one of the mechanisms responsible for improved nutrients utilization (Dibner and Buttin, 2002). Kim et al. (2011) proved that lower numbers of certain gut pathogens such as *E. coli* may improve broiler performance. Furthermore, the morphology of the gut wall is altered by bacterial activity in the gastrointestinal tract (Sakata, 1987; Rebolé et al., 2010). Indeed, an overgrowth of some microorganisms in the intestine has been reported to result in mucosal impairment and villus erosion, thus reducing its absorptive potential of nutrients (Pelicano et al., 2005). According to Bourlioux et al. (2003), enterobacteria can cause damage to the intestinal cells, and Fonseca et al. (2010) linked a decrease in the quantity of cecal enterobacteria with increased ileal villus height. Improvements in performance may be due to changes in the small intestinal morphology, including an increased area for nutrients absorption (Onderci et al., 2006). As nutrients are absorbed via the villus surface area, a greater villus surface area results in greater nutrient absorption (Rezaei et al., 2011), and a shortening of the villi and large crypts can lead to poor nutrient absorption, increased secretion in the gastrointestinal tract, diarrhea, reduced disease resistance, and lower overall performance (Xu et al., 2003). Hampson (1986) established in pigs that the intestinal absorption efficiency is correlated with its surface area, which is in turn affected by villus height and mucosa thickness. In chickens, Parsaie et al. (2007) and Liu et al. (2008) found a relationship between an increase in the height of the intestinal villi and an improved intestinal structure. Also, the morphology of the intestine changed after treatment with antibacterial additives due to increased villus height and mucosal thickness in broilers (Bao et al., 2009). Garlic and its derivatives may have similar effects, as shown in studies carried out in pigs fed aged garlic extract, where increased villus height and width in the small intestine (ileum) were observed (Tatara et al., 2008). The results here reported showed that supplementation of broiler rations with PTS-O had a significantly positive effect on gastrointestinal tract absorptive parameters.

In conclusion, dietary supplementation with the garlic derivative PTS-O at levels studied here (45 to 135 mg/kg of diet) had a beneficial effect by reducing the numbers of pathogens and potentially pathogenic bacteria in intestinal contents, and also by improving the morphological structure of the ileal mucosa and the productive parameters of broiler chickens. Accordingly, this product may represent a valuable alternative in the control of pathogenic bacteria in poultry production. Whereas previously used products are either not properly characterized (garlic powder, aged garlic, dried garlic, and so on) or difficult to obtain and unstable (allicin), PTS-O is a chemically characterized, stable product with defined properties. It may therefore represent a reliable practical alternative to AGP use because it has shown antimicrobial, growth-promoting properties, which are likely to positively influence animal well being and product safety. Due to the potential practical relevance of these results, further research involving experimentally challenged birds is warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (AGL 2009-11925) and also by the FEDER and FSE funds from the European Union. Authors are grateful to A. Nieto (ANAPATH) and L. Lara for excellent technical assistance, and to I. Aranda

(Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, JAE-Doc) for her useful comments. M. J. Peinado acknowledges receipt of a Consejo Superior de Investigaciones Científicas JAE-Predoc grant. They also thank A. L. Tate for revising and editing their English text.

REFERENCES

1. **Amagase H., Petesch B. L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y.** 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131:955S–962S.
2. **Ariga T., Seki T.** 2006. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulphur compounds: A review. *Biofactors* 26:93–103.
3. **Bao H., She R. T., Liu T., Zhang Y., Peng K. S., Luo D., Yue Z.** 2009. Effects of pig antibacterial peptides on growth performance and intestine mucosal immune of broiler chickens. *Poult. Sci.* 88:291–297.
4. **Baurhoo B., Ferket P. R., Zhao X.** 2009. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult. Sci.* 88:2262–2272.
5. **Bjerrum L., Engberg R. M., Leser T. D., Jensen B. B., Finster K., Pedersen K.** 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult. Sci.* 85:1151–1164.
6. **Bourlioux P., Koletzko B., Guarner F. V.** 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:675–683.
7. **Castillo M., Martin-Orue S. M., Manzanilla E. G., Badiola I., Martin M., Gasa J.** 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 114:165–170.
8. **Cavallito C., Bailey J. H.** 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1944–1952.
9. **Cellini L., Di Campli E., Masulli M., Di Bartolomeo S., Allocati N.** 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:273–277.
10. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2008. *Campylobacter general information*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
11. **Choi I. H., Park W. Y., Kim Y. J.** 2010. Effects of dietary garlic powder and α -tocopherol supplementation on performance, serum cholesterol levels, and meat quality of chicken. *Poult. Sci.* 89:1724–1731.
12. **Cortez A. L. L., Carvalho A. C. F. B., Ikuno A. A., Bürger K. P., Vidal-Martins A. M. C.** 2006. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Res. Vet. Sci.* 81:340–344.
13. **Cross D. E., McDevitt R. M., Acamovic T.** 2011. Herbs, thyme essential oil and condensed tannin extracts as dietary supplements for broilers, and their effects on performance, digestibility, volatile fatty acids and organoleptic properties. *Br. Poult. Sci.* 52:227–237.
14. **Curtis H., Noll U., Stormann J., Slusarenko A. J.** 2004. Broad spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant

- pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65:79–89.
15. **De Verdal H., Nancy A., Bastianelli D., Chapuis H., Mème N., Urvoix S., Le Bihan-Duval E., Mignon-Grasteau S.** 2011. Improving the efficiency of feed utilization in poultry by selection. Genetic parameters of excretion traits and correlations with anatomy of the gastro-intestinal tract and digestive efficiency. *BMC Genet.* 12:71.
 16. **Dey A., Samantha A. R.** 1993. Effect of feeding garlic (*Allium sativum* Linn.) as a growth promoter in broilers. *Ind. J. Anim. Health* 32:17–19.
 17. **Dibner J. J., Buttin P.** 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J. Appl. Poult. Res.* 11:453–463.
 18. **Dibner J. J., Richards J. D.** 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poult. Sci.* 84:634–643.
 19. **Eeckhaut V., Van Immerseel F., Dewulf J., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R., Courtin C. M.** 2008. Arabinoxyloligosaccharides from wheat bran inhibit *Salmonella* colonization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 87:2329–2334.
 20. **Feldberg R. S., Chang S. C., Kotik A. N., Nadler M., Neurwirth Z., Sundstrom D. C., Thompson N. H.** 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1763–1768.
 21. **Focke M., Feld A., Lichtenthaler K.** 1990. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS Lett.* 261:106–108.
 22. **Fonseca B. B., Beletti M. E., da Silva M. S., da Silva P. L., Duarte I. N., Rossi D. A.** 2010. Microbiota of the cecum, ileum morphology, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. *R. Bras. Zoot.* 39:1756–1760.
 23. **Garrido M. N., Skjervheim M., Oppegaard H., Sorum H.** 2004. Acidified litter benefits the intestinal flora balance of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5208–5213.
 24. **Gholamiandehkordi A., Eeckhaut V., Lanckriet A., Timbermont L., Bjerrum L., Ducatelle R., Haesebrouck F.** 2009. Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium. *Vet. Res. Commun.* 33:1031–1037.
 25. **Gong J., Yu H., Liu T., Gill J. J., Chambers J. R., Wheatcroft R., Sabour P. M.** 2008. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 104:1372–1382.
 26. **Hampson D. J.** 1986. Alteration in piglet small intestinal structure at weaning. *Res. Vet. Sci.* 40:32–40.
 27. **Harris J. C., Cottrell S. L., Plummer S., Lloyd D.** 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:282–286.
 28. **Hilmarsson H., Thormar H., Thráinsson J. H., Gunnarsson E., Dadadóttir S.** 2006. Effect of glycerol monocaprate (monocaprin) on broiler chickens: An attempt at reducing intestinal *Campylobacter* infection. *Poult. Sci.* 85:588–592.
 29. **Horton G. M. J., Fennell M. J., Prasad B. M.** 1991. Effect of dietary garlic (*Allium sativum*) on performance, carcass composition and blood chemistry changes in broiler chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 71:939–942.
 30. **Iberl B., Winkler G., Muller B., Knobloch K.** 1990. Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.* 56:320–326.
 31. **Jagdish P., Pandey R. C.** 1994. Effect of different levels of garlic inclusion in the ration of cockerels in their growth rate and feed conversion ratio. *Poult. Adv.* 27:39–41.
 32. **Jalahtii J. A. P. A., Kettunen A.** 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial

- communities, with special reference to the chicken. *Poult. Sci.* 60:223–232.
33. **Javandel F., Navidshad R., Seifdavati J., Pourrahimi G. H., Baniyaghoub S.** 2008. The favorite dosage of garlic meal as a feed additive in broiler chickens ratios. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:1746–1749.
 34. **Kim G.-B., Seo Y. M., Kim C. H., Paik I. K.** 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult. Sci.* 90:75–82.
 35. **Lin J.** 2009. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:755–765.
 36. **Line J. E., Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Levchuk V. P.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1094–1100.
 37. **Liu T., She R., Wang K., Bao H., Zhang Y., Luo D., Hul Y.** 2008. Effects of rabbit *sacculus rotundus* antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in chickens. *Poult. Sci.* 87:250–254.
 38. **Loar R. E., Moritz J. S., Donaldson J. R., Corzo A.** 2010. Effects of feeding distillers dried grains with solubles to broilers from 0 to 28 days posthatch on broiler performance, feed manufacturing efficiency, and selected intestinal characteristics. *Poult. Sci.* 89:2242–2250.
 39. **Malinen E., Kassinen A., Rinttilä T., Palva A.** 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149:269–277.
 40. **Martel A., Devriese L. A., Cauwerts K., De Gussem K., Decostere A., Haesebrouck F.** 2004. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.* 33:3–7.
 41. **Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe R. V.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607–625.
 42. **Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Wilchek H., Weiner L.** 2000. The mode of action of allicin: Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1463:20–30.
 43. **Onderci M., Sahin N., Sahin K., Cikim G., Aydın A., Ozercan I., Aydın S.** 2006. Efficacy of supplementation of alpha-amylase-producing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed a corn-based diet. *Poult. Sci.* 85:505–510.
 44. **Ozolin O. N., Uteshev T. A., Kim I. A., Deev A. A., Kamzolova S. G.** 1990. Specific modification of the alpha-subunit of *Escherichia coli* RNAS polymerase by monomeric derivative of fluorescein mercuric acetate. *Mol. Biol. (Mosk.)* 24:1057–1066.
 45. **Parsaie S., Shariatmadari F., Zamiri M. J., Khajeh K.** 2007. Influence of wheat-based diets supplemented with xylanase, bile acid and antibiotics on performance, digestive tract measurements and gut morphology of broilers compared with a maize-based diet. *Br. Poult. Sci.* 48:594–600.

46. **Pelicano E. R. L., Souza P. A., Souza H. B. A., Figueiredo D. F., Boiago M. M., Carvalho S. R., Bordon V. F.** 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz. J. Poult. Sci.* 7:221–229.
47. **Rebolé A., Ortiz L. T., Rodríguez M. L., Alzueta C., Treviño J., Velasco S.** 2010. Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination, on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat- and barley-based diet. *Poult. Sci.* 89:276–286.
48. **Rezaei M., Torshizi K. M., Rouzbehan Y.** 2011. The influence of different levels of micronized insoluble fiber on broiler performance and litter moisture. *Poult. Sci.* 90:2008–2012.
49. **Rinttilä T., Kassinen A., Malinen E., Krogius L., Palva A.** 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 97:1166–1177.
50. **Ross Z. M., O’Gara E. A., Hill D. J., Sleightholme H. V., Maslin D. J.** 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:475–480.
51. **Rubio L. A., Ruiz R., Peinado M. J., Echávarri A.** 2010. Morphology and enzymatic activity of the small intestinal mucosa of Iberian pigs as compared with a lean pig strain. *J. Anim. Sci.* 88:3590–3597.
52. **Ruiz R., García M. P., Lara A., Rubio L. A.** 2010. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Vet. Microbiol.* 144:110–117.
53. **Ruiz R., Rubio L. A.** 2009. Lyophilization improves the extraction of PCR-quality community DNA from pig faecal samples. *J. Sci. Food Agric.* 89:723–727.
54. **Sakata T.** 1987. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial proliferation in the rat intestine: possible explanation for the trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factors. *Br. J. Nutr.* 58:95–103.
55. **SAS Institute.** 2003. *SAS User’s Guide*. Version 9.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
56. **Schrader J. S., Singer R. S., Atwill E. R.** 2004. A prospective study of management and litter variables associated with cellulites in California broiler flocks. *Avian Dis.* 48:522–530.
57. **Sell J. L.** 1996. Physiological limitations and potential for improvement in gastrointestinal tract function of poultry. *J. Appl. Poult. Res.* 5:96–101.
58. **Shi X. H., Li S. Z., Liu Z. P.** 1999. A trial on the use of garlic as a feed additive for meat chickens. *Poult. Husbandry Dis. Control* 10:19–20.
59. **Slavić D., Boerlin P., Fabri M., Klotins K. C., Zoethout J. K., Weir P. E., Bateman D.** 2011. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 75:89–97.
60. **Stappenbeck T. S., Hooper L. V., Gordon J. I.** 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15451–15455.
61. **Tanikawa T., Shoji N., Sonohara N., Saito S., Shimura Y., Fukushima J., Inamoto T.** 2011. Aging transition of the bacterial community structure in the chick ceca. *Poult.*

- Sci.* 90:1004–1008.
62. **Tatara M. R., Śliwa E., Dudek K., Gawron A., Piersiak T., Dobrowolski P., Mosiewicz J., Siwicky A. K., Studzinski T.** 2008. Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. *Ann. Agric. Environ. Med.* 15:63–69.
 63. **Uchida Y., Takahashi T., Sato N.** 1975. The characteristics of the antibacterial activity of garlic. *Jpn. J. Antibiot.* 28:638–642.
 64. **Uni Z., Noy Y., Sklan D.** 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poultry. *Poult. Sci.* 78:215–222.
 65. **Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R.** 2004. Clostridium perfringens in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33:537–549.
 66. **Van Leeuwen P., Mouwen J. M., Van der Klis J. D., Verstegen M. W.** 2004. Morphology of the small intestinal mucosal surface of broilers in relation to age, diet formulation, small intestinal microflora and performance. *Br. Poult. Sci.* 45:41–48.
 67. **Vellinga A., Van Loock F.** 2002. The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related Campylobacter enteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 8:19–22.
 68. **Voidarou C., Bezirtzoglou E., Alexopoulos A., Plessas S., Stefanis C., Papadopoulos I., Vavias S., Stavropoulou E., Fotoua K., Tzora A., Skoufos I.** 2011. Occurrence of Clostridium perfringens from different cultivated soils. *Anaerobe* 17:320–324.
 69. **Wang H.-T., Yu C., Hsieh Y.-H., Chen S.-W., Chen B.-J., Chen C.-Y.** 2011. Effects of albusin B (a bacteriocin) of Ruminococcus albus 7 expressed by yeast on growth performance and intestinal absorption of broiler chickens and its potential role as an alternative to feed antibiotics. *J. Sci. Food Agric.* 91:2338–2343.
 70. **Wen L.-F., He J. G.** 2012. Dose-response effects of an antimicrobial peptide, a Cecropin hybrid, on growth performance, nutrient utilization, bacterial counts in the digesta and intestinal morphology in broilers. *Br. J. Nutr.* 108(10):1756–63
 71. **Xu Z. R., Hu C. H., Xia M. S., Zhan X. A., Wang M. Q.** 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* 82:1030–1036.
 72. **Yang Y., Iji P. A., Kocher A., Mikkelsen L. L., Choct M.** 2008. Effects of dietary mannanoligosaccharide on growth performance, nutrient digestibility and gut development of broilers given different cereal-based diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 92:650–659.
 73. **Zhao C., Ge B., Villena J., Sudler R., Yeh E., Zhao S., White D. G., Wagner D., Meng J.** 2001. Prevalence of Campylobacter spp, Escherichia coli, and Salmonella spp serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5431–5436.

3.2.

**Garlic derivative PTS-O modulates intestinal
microbiota composition and improves
digestibility in growing broiler chickens**

M.J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, I.
Aranda-Olmedo, L.A. Rubio

***Animal Feed Science and Technology*, 2013, 181(1–4), 87–92
doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.03.001**

ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY

ORIGINAL ARTICLE

ELSEVIER

**Garlic derivative PTS-O modulates intestinal
microbiota composition and improves digestibility in
growing broiler chickens**

M.J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, I. Aranda-Olmedo,
L.A. Rubio



***Animal Feed Science and Technology*, 2013,181(1–4), 87–92**
doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.03.001

Received 8 October 2012.

Accepted 11 March 2013

Abstract

The effects of dietary supplementation with two levels (45 and 90 mg/kg diet, diets PTS-O-45 and PTS-O-90, respectively) of the garlic (*Allium sativum*)-derived product PTS-O (propyl propane thiosulfonate) on the intestinal microbiota composition and digestibility of nutrients were studied in growing broiler chickens. Lower ($P < 0.05$) lactobacilli \log_{10} 16S rRNA gene copy numbers with respect to controls were determined in the crop contents of birds fed on both PTS-O supplemented diets. In the ileal contents, PTS-O-45 feeding resulted in lower ($P < 0.05$) *Clostridium coccooides/Eubacterium rectale* and *Clostridium leptum* \log_{10} number of copies. Feeding the PTS-O-90 diet resulted in higher ($P < 0.05$) bacteroides and total bacteria in the ileal contents. Lower ($P < 0.05$) bacteroides \log_{10} number of copies were determined in the caecal contents of birds fed on PTS-O-90, while *C. coccooides/E. rectale* number of copies of chickens fed on PTS-O-45 was also lower ($P < 0.05$) than controls. Energy, fat, ADF and NDF fecal digestibilities were greater ($P < 0.05$) than controls in chickens fed on diets containing PTS-O. N and NSP fecal digestibilities were greater ($P < 0.05$) than controls in chickens fed diets containing PTS-O-90. No significant effect was found in the enzymatic activities (sucrase, maltase, isomaltase, aminopeptidase, and alkaline phosphatase) of ileal mucosal samples between controls and PTS-O fed birds. This investigation confirmed previous data, and showed that PTS-O modulated intestinal microbiota composition and improved nutrients digestibility in growing broilers.

Abbreviations: ADFom-ADF, acid detergent fiber expressed exclusive of residual ash; AMEn, apparent metabolizable energy corrected for N retention; CF, crude fiber; GIT, gastrointestinal tract; aNDFom-NDF, neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash; NSP, non-starch polysaccharides; q-PCR, real time PCR

Keywords: Broiler chickens; Digestibility; Garlic derivatives; Intestinal microbiota; Performance; q-PCR

1. Introduction

The intestinal microbiota of broiler chickens plays an important role in growth performance and health of birds (Bjerrum et al., 2006), and its influence is particularly relevant when chickens are young and their microbiota is still in the process of development (Gong et al., 2008). The interaction of intestinal growth, digestive functions, and diet is critical during the post-hatching period when birds switch to solid feed nutrition (Uni et al., 1999). On the other hand, garlic and garlic products have been found to be effective against many common pathogenic intestinal bacteria responsible for diarrhea in both humans and animals (Amagase et al., 2001 and Tatara et al., 2008), and to exert bacteriostatic effects on some vancomycin-resistant enterococci (Harris et al., 2001). The antimicrobial effects of some organosulphurate compounds industrially obtained from garlic have been previously described both *in vitro* (Ruiz et al., 2010) and *in vivo* (Peinado et al., 2012). The garlic derivative propyl propane thiosulfonate (PTS-O) showed antimicrobial activity against enterobacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter jejuni*. Nevertheless, there is little and controversial

information in the literature concerning the effects of garlic derivatives on other important groups of broiler intestinal microbiota. Furthermore, little information also exists on the effects of garlic or garlic products on nutrients utilization in poultry. Accordingly, the aim of the present study was to investigate the effect of PTS-O dietary supplementation on intestinal microbiota composition and nutrients digestibility in growing broiler chickens.

2. Materials and methods

2.1. Dietary supplements

PROALLIUM-SO-DMC[®] was the commercial preparation used in this study. This product was provided by DMC Research Center S.L. (Granada, Spain). It contained 11.3% of the active compound PTS-O as determined by HPLC according to the procedure described by Iberl et al. (1990). PTS-O was incorporated in an inert commercial alimentary support (cyclodextrin) to produce PROALLIUM-SO-DMC (Ruiz et al., 2010).

2.2. Birds, diets and housing

The experimental protocol was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Spanish Council for Scientific Research (CSIC, Spain), and the animals were cared for in accordance with the Spanish Ministry of Agriculture guidelines (RD 1201/2005). A total of 144 male one-day-old Cobb broiler chickens were randomly assigned to 1 of 3 dietary treatments. Each treatment involved 8 replicates with 6 birds. Birds were weighed on arrival and raised in heated wire-floored batteries, and received a lighting regimen of 23 h light: 1 h darkness. Balanced commercial diets (Peinado et al., 2012) free of any feed antibiotics, and formulated to match the requirements for growing birds of this age and genotype, were used. Diets were fed *ad libitum* for 21 d. The dietary treatments were control (commercial diet with no additive), PTS-O-45 and PTS-O-90 (commercial diet supplemented with 45 and 90 mg PTS-O/kg diet, respectively). The doses of PTS-O used were chosen according to results previously found *in vitro* (Ruiz et al., 2010). Chromium oxide (2 g/kg diet) was added to the diets as an indigestible marker.

2.3. Sacrifice and sample collection

At 21 d of age, three birds per replicate (*i.e.* 18 per treatment) were randomly selected and killed by intra-thoracic injection of 0.2 mL/bird of the euthanasic T-61 (Intervet, Salamanca, Spain). Immediately after sacrifice, samples from the crop, ileal (considered as the section between the Meckel's diverticulum and the ileo-cecal junction) and caecal contents of each bird were collected in plastic tubes, stored at -20 °C, and freeze-dried (Ruiz and Rubio, 2009). Samples for enzyme analysis (5–6 cm in length) in ileal mucosa were taken in duplicate at the mid-point between the Meckel's diverticulum and the ileo-cecal junction. Mucosa was scrapped off the underlying muscular layers, put into eppendorf tubes and kept at -80 °C until analysis.

2.4. Real-time PCR analysis

Samples for microbial analysis were processed as in Peinado et al. (2012). Bacterial numbers in intestinal samples were determined in duplicate by quantitative PCR (q-PCR) assays conducted in 96-well polypropylene plates using an iQ5 Cyclor Multicolour PCR detection system (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA). The 16S rRNA gene-targeted primers used are shown in Table 1. The bacterial number of copies in each sample was measured as \log_{10} copy number by interpolating the C_t values obtained from intestinal samples into the standard calibration curves. Each plate included duplicate reactions per DNA sample and the appropriate set of standards.

Table 1.

Sequences of the primers used and q-PCR conditions for SYBR green 16 rDNA determination of microbial groups in the chicken intestinal samples.

Bacterial group	Primer	Reference	q-PCR conditions
Total bacteria	F-Eub (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) R-Eub 518 (ATTACCGCGGCTGCTGG)	Guo et al. (2008)	Initial denaturation: 1 cycle at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min. Primer annealing and product elongation: 40 cycles at 95 °C for 15s and 60 °C for 1 min
Lactobacilli	F-lacto (GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC) R-lacto (GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC)	Delroisse et al. (2008)	Idem
Bifidobacteria	F-bifido (CGCGTCYGGTGTGAAAG) R-bifido (CCCCACATCCAGCATCCA)	Delroisse et al. (2008)	Idem
Bacteroides	AllBac296F (GAGAGGAAGGTCCCCAC) AllBac412R (CGCTACTTGGCTGGTTCAG)	Layton et al. (2006)	Idem

Bacterial group	Primer	Reference	q-PCR conditions
<i>C. coccoides</i> / <i>E. rectale</i>	g-Ccoc-F (AAATGACGGTACCTGACTAA) g-Ccoc-R (CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA)	Matsuki et al. (2004)	Initial denaturation: 94 °C for 5 min Primer annealing and product elongation: 40 cycles at 94 °C for 20 s, 50 °C for 20 s, and 72 °C for 1 min
<i>C. leptum</i>	sg-Clept-F (GCACAAGCAGTGGAGT) sg-Clept-R3 (CTTCCTCCGTTTTGTCAA)	Matsuki et al. (2004)	Idem

2.5. Chemical and biochemical analysis and calculations

The N contents in feed, ileal contents and feces were determined according to the Dumas procedure using a LECO Truspec CN analyser (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). The analyses of neutral detergent fiber (aNDFom-NDF) and acid detergent fiber (ADFom-ADF) were carried out according to Van Soest et al. (1991) by using an Ankom²²⁰ fiber analyzer unit (Ankom Technology Corp., Macedon, NY). Non-starch polysaccharides (NSP) in diets and fecal samples were determined by GLC as in Englyst et al. (1982). The fat content determination in feed and feces was carried out according to Phillips (1997). The Gross Energy (GE) contained in feed and feces was determined in a bomb calorimeter (Parr 1356 bomb calorimeter, Parr Instruments Co., Moline, IL) using benzoic acid as a calibration standard. Chromium oxide in diets and fecal samples was determined following a colorimetric micromethod (Fenton and Fenton, 1979). Apparent ileal or fecal digestibility (AFD) for each substance (S) (N, ADFom-ADF, aNDFom-NDF, NSP, fat, FC) was obtained from the expression $AFD = 100 \times [1 - (S_f/Cr_2O_{3f}) / (S_d/Cr_2O_{3d})]$, where d and f indicate concentrations in diet and feces, respectively (Rubio et al., 2006). AMEn was calculated as in Hill and Anderson (1958). For enzymatic activity determinations, mucosa samples were homogenized in EDTA-Saline Phosphate Buffer (pH 7.4) by means of a Wiggen Hauser D-500 homogenizer. Protein was determined by using a BCA Protein Assay kit (23225, Meridian Rd, Rockford, U.S.A). The activities of lactase (E.C. 3.2.1.23), sucrase (E.C. 3.2.1.48), maltase (E.C. 3.2.1.20), and isomaltase (E.C. 3.2.1.10) were assayed as in Rubio et al. (2010).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed as a one-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2003), with the pen serving as the experimental unit for performance and fecal

digestibility parameters, and the individual chicken as the experimental unit for ileal digestibility, enzyme activity and microbiological parameters. Treatment means were separated using Bonferroni's multiple comparison tests. Statistical significance was declared at a probability of $P < 0.05$. All microbiological copy numbers were subject to base-10 logarithm transformation before analysis.

3. Results

3.1. Digestibility

As shown in Table 2, energy, fat, ADFom-ADF and aNDFom-NDF fecal digestibilities were greater ($P < 0.05$) than controls in chickens fed on diets containing PTS-O, with values from chickens fed on PTS-O-90 being higher ($P < 0.05$) than those of PTS-O-45. N and NSP fecal digestibilities were greater ($P < 0.05$) than those of controls and PTS-O-45 in chickens fed diets containing PTS-O-90. Ileal N digestibility was not affected by PTS-O supplementation.

Table 2.

AMEn (cal/g), ileal apparent N digestibility and fecal apparent digestibility of energy, N, fat, aNDFom-NDF, ADFom-ADF and total NSP of growing broiler chickens fed on PTS-O supplemented diets.

	Control	PTS-O-45	PTS-O-90	Pooled SD	P value
AMEn (cal/g)	3321 ^a	3356 ^b	3448 ^c	33	<0.01
Ileal					
N	0.83	0.83	0.82	0.02	0.06
Fecal					
Energy	0.84 ^a	0.85 ^b	0.88 ^c	0.01	<0.01
N	0.76 ^a	0.77 ^a	0.80 ^b	0.02	<0.01
Fat	0.94 ^a	0.95 ^b	0.96 ^b	0.01	<0.01
aNDFom- NDF	0.66 ^a	0.68 ^b	0.73 ^c	0.01	<0.01
ADFom-ADF	0.39 ^a	0.43 ^b	0.53 ^c	0.03	<0.01
NSP	0.59 ^a	0.62 ^a	0.72 ^b	0.04	<0.01

PTS-O propyl propane thiosulfonate.

Means in each row with different superscript letters (a, b, c) differ ($P < 0.05$).

3.2. Microbiota composition

As shown in Fig. 1, lower ($P < 0.05$) \log_{10} number of copies of lactobacilli, enterobacteria and *E. coli* were determined respect to controls in the crop contents of birds fed on both PTS-O supplemented diets. In the ileal contents, PTS-O-45 feeding resulted in lower ($P < 0.05$) *Clostridium coccooides*/*Eubacterium rectale* and *Clostridium leptum* \log_{10} number of copies, while PTS-O-90 gave place to lower ($P < 0.05$) enterobacteria and higher ($P < 0.05$) total bacteria and bacteroides \log_{10} number of copies. Lower ($P < 0.05$) *E. coli* and bacteroides \log_{10} number of copies were determined in the caecal contents of birds fed on the PTS-O-90 diet, while *C. coccooides*/*E. rectale* number of copies of chickens fed on the PTS-O-45 diet was also lower ($P < 0.05$) than controls. The differences in copy numbers of bacterial groups among treatments were within 0.5 \log_{10} units, except for crop lactobacilli and ileal bacteroides which reached 1.0 \log_{10} units.

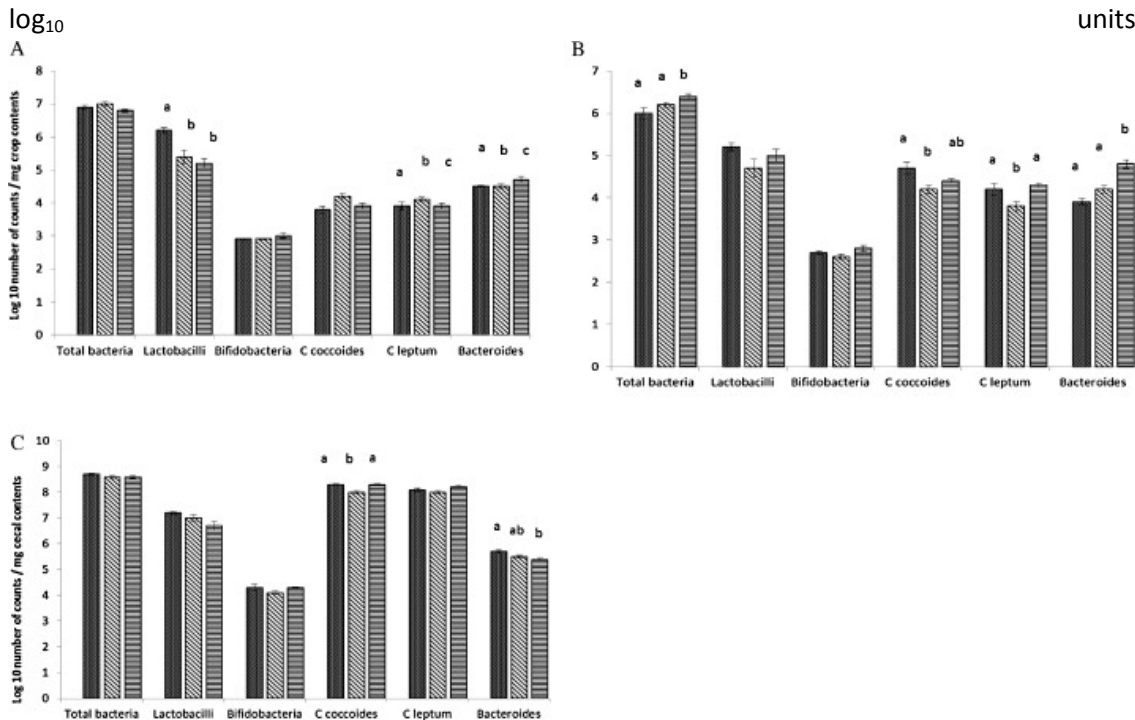


Figure 1.

\log_{10} number of copies/mg dry intestinal content (A, crop; B, ileum; C, cecum) in broiler chickens fed on diets containing no additive (control) (solid bars) or PTS-O (striped sided lines, 45 ppm; striped horizontal lines, 90 ppm) containing diets. Values are means of 18 values with their SEM in bars. Bars with different letters for each bacterial group differ ($P < 0.05$).

3.3. Enzymatic activity

No significant ($P > 0.05$) effect was found in the enzymatic activities (units/mg protein) of sucrase, maltase, isomaltase, aminopeptidase or alkaline phosphatase in ileal mucosal samples between controls and PTS-O fed birds at both doses assayed.

4. Discussion

Improving feed efficiency is a major factor in reducing the costs of poultry production (De Verdal et al., 2011), and improvements in growth and *F/G* ratios in broilers fed on diets containing PTS-O have been previously reported (Peinado et al., 2012). Although some controversy exists in the literature on the effects *in vivo* of diets supplemented with garlic or garlic products, the advantage of the results here and previously reported mainly lies in the fact that a defined, stable, chemically well characterized compound was used (Ruiz et al., 2010).

In line with these previous data on performance, AMEn and fecal digestibility of energy, N, fat, fiber and NSP were greater than controls in PTS-O fed chickens (Table 2) in the current work. The amounts of soluble NSP in wheat have been inversely correlated with dietary metabolizable energy (ME_n)-values in broiler chickens fed on wheat-based diets (Annison, 1991), which was attributed to increased viscosity and lower digestibility of fat and other nutrients (Choct et al., 1996 and Malayoğ lu et al., 2010). However, the amounts of wheat in the diets here used (15%) were probably not enough to affect significantly the viscosity of the intestinal contents. Another possible explanation for the higher nutrients utilization in PTS-O fed birds is the NSP fermentation by the intestinal microbiota in the hind gut. In fact, Jorgensen et al. (1996) reported a value of 42 kJ/d of energy derived from wheat bran NSP in broilers. According to McBurney and Sauer (1993), hind gut fermentation of fiber would provide a maximum of 13 kJ/g fermentable dietary fiber coming from short chain fatty acids absorption. The differences in the amount of NSP digested per kg diet between control and PTS-O diets were ~4.9 and 20 g respectively, which would amount ~63 and 260 kJ (4.9×13 kJ/g and $20 \text{ g} \times 13$ kJ/g, respectively) more energy absorbed by PTS-O fed birds.

Garlic extracts have been reported to exert antimicrobial activity against potentially pathogenic populations, and the antibacterial activity of garlic is widely attributed to its major thiosulfinate, allicin (Ariga and Seki, 2006). Ruiz et al. (2010) and Peinado et al. (2012) demonstrated a bactericidal effect of PTS-O *in vitro* and *in vivo* respectively against enterobacteria, coliforms, *E. coli*, *C. jejuni* and *Salmonella* spp. An overgrowth of some microorganisms including enterobacteria and *E. coli* in the intestine has been reported to result in mucosal impairment, villus erosion and damage to the intestinal cells, thus reducing its nutrients absorptive potential and performance (Pelicano et al., 2005 and Kim et al., 2011). Also, some recent reports in piglets (Gerritsen et al., 2010) suggest that decreased enterobacteria and *E. coli* in distal parts of the intestine would create a better environment for the growth of polysaccharide degrading bacteria and improve digestibility and performance. On the other hand, lactobacilli numbers (Fig. 1) were lower in the crop of PTS-O fed birds, and tended to be lower in the ileum and caeca in the current work, which was accompanied by an increase in the bacteroides number of copies in the ileum. Although generally regarded as a beneficial group, higher numbers of lactobacilli have been arguably implicated in broiler growth depression due to competition for nutrient uptake or impaired fat absorption linked to deconjugation of bile acids (Guban et al., 2006 and Torok et al., 2011). Meanwhile, species from the Bacteroidetes family are involved in many important metabolic activities including fermentation of carbohydrates, induction of critical glycolytic enzymes in the enterocytes,

utilization of nitrogenous substances, biotransformation of bile acids and prevention of pathogen colonization (Bry et al., 1996 and Phillips, 2009). In fact, we have determined (unpublished work) a high statistical positive correlation between fiber and NSP digestibilities and ileal bacteroides relative counts in broilers. In summary, according to the literature and the current results, it can be hypothesized that a decrease in the numbers of some bacterial groups such as enterobacteria, and probably lactobacilli, accompanied by an increase in others such as bacteroides in the intestine might be related with improved performance in poultry. Ongoing work in our lab is devoted to study the potential relationship between physiological parameters and changes in intestinal microbiota composition of broilers. Anyway, with the information existing at present, a possible effect of PTS-O derived from other mechanisms, or even after its intestinal absorption, cannot be ruled out.

Although PTS-O dietary supplementation has been previously shown to improve intestinal histological structure (Peinado et al., 2012), no difference was found in the present work on the enzymatic activities of sucrase, maltase, isomaltase, aminopeptidase, and alkaline phosphatase between controls and PTS-O fed birds in ileal mucosal samples (Table 3). Differences in intestinal bacterial counts in broilers have been previously reported to be accompanied (Yang et al., 2008) or not (Williams et al., 2008 and Shakouri et al., 2009) by variations in intestinal enzymes activities, which shows that more research is required in this area to establish the possible relationship between microbiota composition and intestinal enzyme activities. This is an important point due to the direct relationship between intestinal enzyme activity and nutrients digestibility.

Table 3.

Mucosal protein content (mg/g of mucosa) and enzymatic specific activity^A in the ileal mucosa of broiler chickens fed on diets supplemented with PTS-O from 1 to 21 d of age.

	Control	PTS-O-45	PTS-O-90	Pooled SD	P value
Mucosal protein	75.3	75.8	67.9	8.4	0.17
Sucrase	0.13	0.10	0.11	0.02	0.06
Maltase	0.83	0.74	0.80	0.12	0.41
Isomaltase	0.34	0.30	0.33	0.05	0.25
Aminopeptidase	182	197	200	46	0.45
Alkaline phosphatase	1.4	1.5	1.9	0.7	0.26

A Units per mg of protein. For details see Section 2.

In conclusion, dietary supplementation with the garlic derivative PTS-O at the levels here studied (45 and 90 mg/kg diet) modulated intestinal microbiota composition and improved nutrients digestibility without affecting mucosal enzyme activity in growing broilers. Whilst previously used products are either not sufficiently characterized (garlic powder, aged garlic, dried garlic, etc.) or difficult to obtain and unstable (allicin), PTS-O is a chemically

characterized, stable product with defined properties. It may therefore represent a reliable practical alternative to antibiotic growth promoters use since it has shown antimicrobial, growth promoting properties. These results have important scientific and commercial implications and further research is warranted.

Acknowledgements

This research has been supported by the Spanish MEC (AGL 2009-11925) and also by the FEDER and FSE funds from the European Union. M.J. Peinado and I.A.-O. acknowledge receipt of CSIC JAE-Predoc and JAE-Doc contracts, respectively.

References

- H. Amagase, B.L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga, Y. Itakura.** Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131 (2001), pp. 955S–962S.
- G. Annison.** Relationship between the levels of soluble non-starch polysaccharides and the apparent metabolisable energy of wheats assayed in broiler chickens. *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991), pp. 1252–1256.
- T. Ariga, T. Seki.** Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulphurcompounds: a review. *Biofactors.* 26 (2006), pp. 93–103.
- L. Bjerrum, R.M. Engberg, T.D. Leser, B.B. Jensen, K. Finster, K. Pedersen.** Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult. Sci.* 85 (2006), pp. 1151–1164
- L. Bry, P.G. Falk, T. Midtvedt, J.I. Gordon.** A model of host–microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science.* 273 (1996), pp. 1380–1383
- M. Choct, R.J. Hughes, J. Wang, M.R. Bedford, A.J. Morgan, G. Annison.** Increased small intestinal fermentation responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *Br. Poult. Sci.* 37 (1996), pp. 609–621
- J.M. Delroisse, A.L. Bolvin, I. Parmentier, R.D. Dauphin, M. Vandebol, D. Portetelle.** Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiol. Res.* 163 (2008), pp. 663–670
- H. De Verdal, A. Narcy, D. Bastianelli, H. Chapuis, N. Mème, S. Urvoix, E. Le Bihan-Duval, S. Mignon-Grasteau.** Improving the efficiency of feed utilization in poultry by selection. Genetic parameters of excretion traits and correlations with anatomy of the gastro-intestinal tract and digestive efficiency. *BMC Genet.* 17 (2011), pp. 12–71.

H.N. Englyst, M.E. Quigley, G.J. Hudson, J.H. Cummings. Determination of dietary fiber as non-starch polysaccharides by gas–liquid chromatography. *Analyst*. 117 (1982), pp. 1707–1714

T.W. Fenton, M. Fenton. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and faeces. *Can. J. Anim. Sci.* 59 (1979), pp. 631–634

R. Gerritsen, A.J. van Dijk, K. Rethy, P. Bikker. The effect of blends of organic acids on apparent faecal digestibility in piglets. *Livest. Sci.* 134 (2010), pp. 246–248

J. Gong, H. Yu, T.J. Liu, J. Gill, J.R. Chambers, R. Wheatcroft, P.M. Sabour. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008), pp. 1372–1382

X. Guo, X. Xia, R. Tang, J. Zhao, K. Wang. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47 (2008), pp. 367–373

J. Guban, D. Korver, G. Allison, G. Tannock. Relationship of dietary antimicrobial drug administration with broiler performance, decreased population levels of *Lactobacillus salivarius*, and reduced bile salt deconjugation in the ileum of broiler chickens. *Poult. Sci.* 85 (2006), pp. 2186–2194

J.C. Harris, S.L. Cottrell, S. Plummer, D. Lloyd. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (2001), pp. 282–286

F.W. Hill, D.L. Anderson. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J. Nutr.* 64 (1958), pp. 587–603.

B. Iberl, G. Winkler, B. Muller, K. Knobloch. Quantitative determination of alliin Manuscriptand alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.* 56 (1990), pp. 320–326.

H. Jorgensen, X.-Q. Zhao, K.E.B. Knudsen, B.O. Eggum. The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 75 (1996), pp. 379–395

G.-B. Kim, Y.M. Seo, C.H. Kim, I.K. Paik. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult. Sci.* 90 (2011), pp. 75–82

A. Layton, L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry, G. Sayler. Development of Bacteroides 16S rRNA gene Taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006), pp. 4214–4224

H.B. Malayoğ lu, S. Baysal, Z. Misirlioğ lu, M. Polat, H. Yilmaz, N. Turan. 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. *Br. Poult. Sci.* 51 (2010), pp. 67–80

T. Matsuki, K. Watanabe, J. Fujimoto, T. Takada, R. Tanka. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human faeces. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004), pp. 7220–7228

M.I. McBurney, W.C. Sauer. Fibre and large bowel energy absorption: validation of the integrated ileostomy-fermentation model using pigs. *J. Nutr.* 123 (1993), pp. 721–727

M.J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, L.A. Rubio. Garlic derivative PTS-O is effective against broiler pathogens *in vivo*. *Poult. Sci.* 91 (2012), pp. 2148–2157.

E.R.L. Pelicano, P.A. Souza, H.B.A. Souza, D.F. Figueiredo, M.M. Boiago, S.R. Carvalho, V.F. Bordon. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz. J. Poult. Sci.* 7 (2005), pp. 221–229

M. Phillips. Simplified gravimetric determination of total fat in food composites after chloroform–methanol extraction. *JAOCS.* 74 (2) (1997), pp. 137–142

M.L. Phillips. Gut reaction: environmental effects on the human microbiota. *Environ. Health Perspect.* 117 (2009), pp. A198–A205

L.A. Rubio, M.M. Pedrosa, C. Cuadrado, E. Gelencser, A. Clemente, C. Burbano, M. Muzquiz. Recovery at the terminal ileum of cannulated pigs of some legume non-nutritional factors with potentially health beneficial effects. *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006), pp. 979–987

L.A. Rubio, R. Ruiz, M.J. Peinado, A. Echávarri. Morphology and enzymatic activity of the small intestinal mucosa of Iberian pigs as compared with a lean pig strain. *J. Anim. Sci.* 88 (2010), pp. 3590–3597

R. Ruiz, L.A. Rubio. Lyophilization improves the extraction of PCR-quality community DNA from pig faecal samples. *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009), pp. 723–727.

R. Ruiz, M.P. García, A. Lara, L.A. Rubio. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota *in vitro*. *Vet. Microbiol.* 144 (2010), pp. 110–117

M.D. Shakouri, P.A. Iji, L.L. Mikkelsen, A.J. Cowieson. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93 (2009), pp. 647–658

M.R. Tatara, E. Śliwa, K. Dudek, A. Gawron, T. Piersiak, P. Dobrowolski, J. Mosiewicz, A.K. Siwicki, T. Studzinski. Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. *Ann. Agric. Environ. Med.* 15 (2008), pp. 63–69.

V.A. Torok, R.J. Hughes, L.L. Mikkelsen, R.P. Pérez-Maldonado, K. Balding, R. MacAlpine, N.J. Percy, K. Ophel-Keller. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011), pp. 5868–5878

Z. Uni, Y. Noy, D. Sklan. Posthatch development of small intestinal function in the poultry. *Poult. Sci.* 78 (1999), pp. 215–222

P.J. Van Soest, J.B. Robertson, B.A. Lewis. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 (1991), pp. 3583–3597

J. Williams, S. Mallet, M. Leconte, M. Lessire, I. Gabriel. The effects of fructo-oligosaccharides or whole wheat on the performance and digestive tract of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 49 (2008), pp. 329–339

Y. Yang, P.A. Iji, A. Kocher, L.L. Mikkelsen, M. Choct. Effects of dietary mannanoligosaccharide on growth performance, nutrient digestibility and gut development of broilers given different cereal-based diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92 (2008), pp. 650–659

3.3.

Correlations between changes in intestinal microbiota composition and performance parameters in broiler chickens

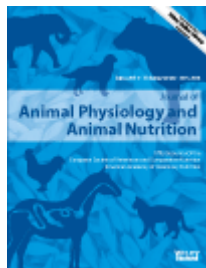
L. A. Rubio, M. J. Peinado, R. Ruiz, E. Suárez-Pereira, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (2015) 99 (3), 418-423.

DOI: 10.1111/jpn.12256

Correlations between changes in intestinal microbiota composition and performance parameters in broiler chickens

L. A. Rubio, M. J. Peinado, R. Ruiz, E. Suárez-Pereira, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández.



Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2015, 99 (3), 418-423.

doi: 10.1111/jpn.12256

Received: July 9, 2013.

Accepted: September 4, 2014

Keywords: broiler, correlation, intestinal microbiota, nutritional parameters.

Summary

Growing male Cobb broiler chickens were fed on diets supplemented with additives reported as able to influence intestinal microbiota composition. The diets used were a balanced commercial diet (no additive), inulin (20 g/kg), fructose caramel (FC, 20 g/kg) and the garlic derivative PTS-O (propyl propane thiosulfonate, 45 and 90 mg/kg diet). The composition of the intestinal microbiota was analysed by qPCR at different points of the intestinal tract, and a number of nutritional parameters were also determined. The relative amounts of bacteroides (bacteroides/total bacteria) in the ileal contents correlated ($p < 0.05$) positively with faecal NDF, ADF, hemicellulose and cellulose digestibility. The relative amounts of *Escherichia-Shigella* (*Escherichia-Shigella*/total bacteria) in the crop contents correlated ($p = 0.05$) negatively with weight gain of broilers. Faecal N digestibility correlated ($p < 0.05$) negatively with total bacteria in the ileal contents of chickens. The relative amounts of *Escherichia-Shigella* (*Escherichia-Shigella*/total bacteria) in the caecal contents correlated ($p = 0.05$) negatively with faecal fat digestibility of broilers. Total bacteria in ileal or caecal contents of growing chickens correlated ($p < 0.05$) negatively with ileal N digestibility. The results here reported suggest that positive or negative correlations can be found between performance parameters and changes in intestinal microbiota composition of growing broiler chickens.

Introduction

The first goal of livestock production is the delivery of safe foods for human consumption taking into account the welfare of the animal, respect for the environment and performance parameters. The intestinal microbiota composition is known to have an incidence in all of these three areas (Gaggia et al., 2010). The use for decades of antibiotics as growth promoters (AGP) is perhaps the best example of the relationship between changes in microbiota composition and some performance parameters. The intestinal microbiota of broiler chickens play an important role in growth performance and health of birds (Bjerrum et al., 2006), and its influence is particularly relevant when chickens are young and their microbiota is still in the process of development (Gong et al., 2008). However, despite its scientific and practical relevance and the increasing interest of the issue, the study of the relationship between variations of the microbiota composition and performance parameters still requires more scientific effort to arrive to reliable conclusions.

Some approaches have been previously used to address this issue. Thus, Stanley et al. (2012) found differences in intestinal microbiota composition of birds from the same batch with high and low feed conversion ratios. Also, Torok et al. (2008) used a model based on the use of enzymes in the diet to modify the composition of the microbiota and studied the performance parameters in this model. However, in this approach, it is difficult to establish whether or not the effect on the intestinal microbiota is the consequence of changes in digestibility after the use of the enzymes. Accordingly, we propose here a different approach

based on the study of the relationship between changes in the composition of the intestinal microbiota and production parameters using additives that have a direct effect on the intestinal microbiota composition. In previous works by our group, some additives such as PTS-O (propyl propane thiosulfonate) and FC (a di-d-fructose dianhydride-enriched caramel) have proved effective through different mechanisms to modify the intestinal microbiota using *in vitro* and *in vivo* models (Ruiz et al., 2010; Peinado et al., 2013a,b), and differences in performance parameters were also observed. Therefore, we propose here the use of these models to study, in the same production conditions (genotype, diet, environmental conditions), the relationship between population changes in the microbiota and certain changes in performance and physiological parameters. The aim of the present work was therefore to study correlations between changes in the proportions of some of the main bacterial groups of the intestinal microbiota and performance parameters in growing broiler chickens. Those changes were achieved using feed additives (inulin, FC and PTS-O) able to modulate broiler intestinal microbiota composition. The final goal was trying to identify microbial groups likely to be implicated, either positively or negatively, in variations of the performance parameters of broilers. Finally, a quantitative technique such as qPCR analysis of some defined bacterial groups was used, instead of a high-throughput procedure, also due to its higher specificity.

Dietary supplements

Details on the chemical nature of FC (a di-d-fructose dianhydride-enriched caramel) and the garlic derivative PTS-O (propyl propane thiosulfonate) were previously reported (Ruiz et al., 2010; Peinado et al., 2012; Peinado et al., 2013a,b). Inulin (92.8%) was from Farmusal (Granada, Spain).

Animals, diets and housing

A total of 240 male one-day-old Cobb broiler chickens were randomly assigned to 1 of 5 dietary treatments. Each treatment involved eight replicates with six birds each. Birds were weighed on arrival and raised in heated wire-floored batteries, and received a lighting regimen of 23-h light:1-h darkness. Balanced commercial diets (Peinado et al., 2012) free of any feed antibiotics, and formulated to match the requirements for growing birds of this age and genotype, were used. Diets were fed *ad libitum* for 21 days. The dietary treatments were control (commercial diet with no additive), PTS-O-45 and PTS-O-90 (commercial diet supplemented with 45 and 90 mg PTS-O/kg diet respectively), inulin (20 g/kg) and FC (20 g/kg). The doses of PTS-O used were chosen according to results previously found *in vitro* (Ruiz et al., 2010). Chromium oxide (2 g/kg diet) was added to the diets as an indigestible marker. The experimental protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Spanish Council for Scientific Research (CSIC, Spain), and the animals were cared for in accordance with the Spanish Ministry of Agriculture guidelines (RD 1201/2005).

Sample collection and analysis of microbiota

At 21 days of age, two birds per replicate (i.e. 12 per treatment) were randomly selected and killed by intrathoracic injection of 0.2 ml/bird of the euthanasic T-61 (Intervet,

Salamanca, Spain). Immediately after sacrifice, samples from the crop, ileal (considered as the section between the Meckel's diverticulum and the ileo-caecal junction) and caecal contents of each bird were collected in plastic tubes, stored at -20°C and freeze-dried (Peinado et al., 2012). Real-time PCR analysis for microbiota determinations and chemical and biochemical analysis and calculations for nutritional parameters were as previously reported (Peinado et al., 2012; Peinado et al., 2013a,b). Briefly, total DNA was isolated from freeze-dried caecal samples (40 mg) using the QIAamp DNA stool kit (Qiagen, West Sussex, UK) by following manufacturer's instructions. To increase its effectiveness, the lysis temperature was increased to 95°C and an additional step with lysozyme (10 mg/ml, 37°C , 30 min) incubation was added. Eluted DNA was treated with RNase, and the DNA concentration assessed spectrophotometrically using a NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Purified DNA samples were stored at -20°C until use (Ruiz and Rubio, 2009). Bacterial \log_{10} number of copies was determined in caecal samples using qPCR. The 16S rRNA gene-targeted primers and PCR conditions used in this study were as in Peinado et al. (2013a). The microbial groups here quantified were chosen for the following reasons: (i) they are among the most abundant bacterial residents of chicken GIT (Stanley et al., 2014) and (ii) we had previous information on them in similar trials (Peinado et al., 2013a,b).

Statistical analysis

Regression equations were calculated where ordinate values (y) represent the performance parameters measured, and abscissa (x) values were the proportion of each bacterial group respect to the total bacteria (bacterial groups and total bacteria expressed as \log_{10} number of copies) in the contents of the intestinal sections of chickens. Twelve birds were used from each treatment for the determination of microbiological and performance parameters. The individual chicken was the experimental unit, and all correlations were calculated for each bacterial group proportion and performance parameter in the 12 birds used. Therefore, we had 12 points for each correlation equation. Regression equations and significances were obtained using the REG procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Correlations were considered significant for p values <0.05 , and reported as tendencies for p values between 0.05 and 0.1.

Results on the effects of PTS-O and FC dietary supplementation on microbiota composition and performance parameters in broilers have been published elsewhere (Peinado et al., 2012, 2013a,b). Correlations between bacterial relative amounts and performance parameters are shown in Table 1.

Table 1.					
Regression equations where ordinate values (y) represent the performance parameters measured, and abscissa (x) values are the proportion of each bacterial group respect to the total bacteria (both expressed in total \log_{10} number of copies) in the contents of the intestinal sections					
Section	Bacterial group (x)	Parameter (Y)	Regression equation	r^2	p value

Table 1.

Regression equations where ordinate values (y) represent the performance parameters measured, and abscissa (x) values are the proportion of each bacterial group respect to the total bacteria (both expressed in total log₁₀ number of copies) in the contents of the intestinal sections

Section	Bacterial group (x)	Parameter (Y)	Regression equation	r ²	p value
Crop	<i>C. coccoides</i> /total bacteria	Weight gain (g)	$Y = 2644X + 2904$	0.906	0.013
	<i>C. coccoides</i> /total bacteria	Final weight (g)	$Y = 467X + 513$	0.864	0.022
	<i>C. coccoides</i> /total bacteria	Faecal fat digestibility (%)	$Y = 0.211X + 0.912$	0.661	0.126
	Enterobacteria/total bacteria	Weight gain (g)	$Y = -63X + 3462$	0.534	0.161
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal N _a digestibility (%)	$Y = -0.022X + 0.819$	0.547	0.147
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal fat digestibility (%)	$Y = -0.007X + 0.959$	0.671	0.065
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal NDF digestibility (%)	$Y = -0.021X + 0.724$	0.667	0.091
Ileum	Enterobacteria/total bacteria	Faecal ADF digestibility (%)	$Y = -0.040X + 0.522$	0.700	0.078
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal hemicellulose digestibility (%)	$Y = -0.015X + 0.783$	0.614	0.117
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal cellulose digestibility (%)	$Y = -0.032X + 0.536$	0.637	0.105
	<i>Escherichia-Shigella</i> /total bacteria	Weight gain (g)	$Y = -73X + 3453$	0.693	0.050
	<i>Escherichia-Shigella</i> /total bacteria	Final weight (g)	$Y = -13X + 609$	0.778	0.061
	<i>Escherichia-Shigella</i> /total bacteria	Faecal N ^a digestibility (%)	$Y = -0.016X + 0.798$	0.517	0.171
	Bacteroides/total bacteria	Faecal E digestibility (%)	$Y = 0.034X + 0.808$	0.703	0.076
	Bacteroides/total bacteria	Faecal N ^a digestibility (%)	$Y = 0.044X + 0.727$	0.734	0.063
	Bacteroides/total bacteria	Faecal fat digestibility (%)	$Y = 0.016X + 0.924$	0.656	0.097
	Bacteroides/total bacteria	Faecal NDF digestibility (%)	$Y = 0.055X + 0.625$	0.987	0.001
Bacteroides/total bacteria	Faecal ADF digestibility (%)	$Y = 0.102X + 0.337$	0.990	0.001	
Bacteroides/total bacteria	Faecal hemicellulose digestibility (%)	$Y = 0.040X + 0.712$	0.946	0.005	
Bacteroides/total bacteria	Faecal cellulose digestibility (%)	$Y = 0.086X + 0.383$	0.997	0.001	

Table 1.					
Regression equations where ordinate values (y) represent the performance parameters measured, and abscissa (x) values are the proportion of each bacterial group respect to the total bacteria (both expressed in total log ₁₀ number of copies) in the contents of the intestinal sections					
Section	Bacterial group (x)	Parameter (Y)	Regression equation	r²	p value
	Enterobacteria/total bacteria	Weight gain (g)	$Y = -78X + 3468$	0.569	0.141
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal fat digestibility (%)	$Y = -0.009X + 0.957$	0.624	0.112
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal NDF digestibility (%)	$Y = -0.021X + 0.718$	0.466	0.200
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal hemicellulose digestibility (%)	$Y = -0.017X + 0.783$	0.568	0.141
	Total bacteria	Ileal N digestibility (%)	$Y = -0.044X + 1.116$	0.964	0.003
Caeca	Lactobacilli/total bacteria	Weight gain (g)	$Y = 88X + 2980$	0.662	0.094
	Lactobacilli/total bacteria	Final weight (g)	$Y = 17X + 522$	0.724	0.067
	Enterobacteria/total bacteria	Weight gain (g)	$Y = -1218X + 3512$	0.902	0.014
	Enterobacteria/total bacteria	Final weight (g)	$Y = -2134X + 620$	0.845	0.027
	Enterobacteria/total bacteria	Faecal fat digestibility (%)	$Y = -0.110X + 0.962$	0.837	0.069
	<i>Escherichia-Shigella</i> /total bacteria	Faecal fat digestibility (%)	$Y = -0.154X + 0.970$	0.638	0.012
	<i>Escherichia-Shigella</i> /total bacteria	Faecal hemicellulose digestibility (%)	$Y = -0.328X + 0.805$	0.521	0.168
	Total bacteria	Ileal N digestibility (%)	$Y = -0.053X + 1.286$	0.833	0.021

^a Values not corrected for urinary N.

Crop

The relative amounts of *Clostridium coccooides* (*C. coccooides*/total bacteria) in the crop contents correlated ($p < 0.05$) positively with weight gain and final weight of broilers. Faecal fat digestibility tended ($p = 0.126$) to correlate positively with the relative amounts of *C. coccooides* (*C. coccooides*/total bacteria) in the crop contents. The relative amounts of enterobacteria (enterobacteria/total bacteria) in the crop contents tended to correlate negatively with faecal fat digestibility ($p = 0.065$), faecal NDF digestibility ($p = 0.091$) and faecal

ADF digestibility ($p = 0.078$). The relative amounts of *Escherichia-Shigella* (*Escherichia-Shigella*/total bacteria) in the crop contents correlated ($p < 0.05$) negatively with weight gain of broilers and tended to correlate negatively with final weight ($p = 0.061$).

Ileum

The relative amounts of bacteroides (bacteroides/total bacteria) in ileal contents correlated ($p < 0.05$) positively with faecal NDF, ADF, hemicellulose and cellulose digestibility and tended to correlate positively with faecal E digestibility ($p = 0.076$), faecal N digestibility ($p = 0.063$) and faecal fat digestibility ($p = 0.097$) of broilers. Ileal N digestibility correlated ($p < 0.05$) negatively with total bacteria in the ileal contents of chickens.

Ceca

The relative amounts of lactobacilli (lactobacilli/total bacteria) in caecal contents tended to correlate positively with weight gain ($p = 0.094$) and final weight ($p = 0.067$) of broilers. The relative amounts of enterobacteria (enterobacteria/total bacteria) in the crop contents correlated ($p < 0.05$) negatively with weight gain and final weight of birds and tended to correlate negatively with faecal fat digestibility ($p = 0.069$). The relative amounts of *Escherichia-Shigella* (*Escherichia-Shigella*/total bacteria) in the caecal contents correlated ($p = 0.05$) negatively with faecal fat digestibility of broilers. Ileal N digestibility correlated ($p < 0.05$) negatively with total bacteria in the caecal contents of birds.

Discussion

AMEn and faecal digestibility of energy, N, fat, fibre and NSP were greater than controls in PTS-O fed chickens, together with improved growth and F/G ratio. This was linked to higher NSP digestibility, which would result in a decrease in NSP amounts within the intestine and consequently increase nutrients digestibility and AMEn (Peinado et al., 2013a). As for the other additive here used, faecal energy, fat, fibre and NSP apparent digestibilities were greater than controls in chickens fed on FC-supplemented diets (Peinado et al., 2013b).

An overgrowth in the intestine of some micro-organisms including enterobacteria has been reported to result in mucosal impairment, villus erosion and damage to the intestinal cells, thus reducing its nutrients absorptive potential (Bourlinoux et al., 2003; Pelicano et al., 2005). Fonseca et al. (2010) linked a decrease in the quantity of caecal enterobacteria with improved performance in broilers, and Kim et al. (2011) proved that lower numbers of certain gut pathogens such as *E. coli* may improve broiler performance. Some recent reports in piglets (Gerritsen et al., 2010) suggest that decreased enterobacteria and *E. coli* counts in distal parts of the intestine would create a better environment for the growth of polysaccharide degrading bacteria and improve digestibility and performance. In line with these previous reports, negative correlations were determined between *Escherichia-Shigella* or enterobacteria relative amounts in crop, ileum and caeca and weight gain or digestibility of nutrients. This is in agreement with a bactericidal effect of PTS-O against enterobacteria, coliforms, *E. coli*,

Campylobacter jejuni and *Salmonella* spp which has been also observed both *in vitro* and *in vivo* (Ruiz et al., 2010; Peinado et al., 2012). These results are also in line with those by Stanley et al. (2012) who concluded that it is more likely that birds showing lower performance indices contain microbes that negatively influence their nutrient uptake efficiency rather than that high-performance birds harbour microbes that contribute to more efficient performance.

A significant positive correlation was found for *C. coccoides* relative amounts in birds crop contents and growth. *C. coccoides* subgroup consists of *C. coccoides*, *Eubacterium rectale* and other bacteria producing butyrate, which has been reported to promote gut health through cell proliferation and colonic cell turnover (Gong et al., 2002). In line with this result, Stanley et al. (2012) found that the closest blast matches to three potentially performance beneficial operational taxonomic units were related to the order *Clostridiales*, and particularly to *C. cellulosi*, a cellulose degrader. Regarding lactobacilli, although generally regarded as a beneficial group, higher numbers of lactobacilli have been implicated in broiler growth depression due to competition for nutrients uptake or impaired fat absorption linked to deconjugation of bile acids (Torok et al., 2011). In the present investigation, a tendency for positive correlations between the relative amounts of lactobacilli and broilers weight gain was found only in the caecal contents. No significant correlation was determined between relative lactobacilli counts in crop or ileal contents and growth or nutrients digestibility. This is in keeping with lower numbers of lactobacilli in intestinal contents of birds fed on diets containing PTS-O or FC together with better performance values previously reported (Peinado et al., 2012, 2013a,b). In addition, as results vary for the different intestinal sections studied, these data suggest that it is important to consider carefully what samples (crop, ileal, caecal, faecal) are used to study the potential relationships between relative bacterial counts and performance parameters in chickens, as results could lead to very different conclusions. Species from the Bacteroidetes family are involved in many important metabolic activities including fermentation of carbohydrates, induction of critical glycolytic enzymes in the enterocytes, utilization of nitrogenous substances, biotransformation of bile acids and prevention of pathogen colonization (Bry et al., 1996; Phillips, 2009). Higher ileal log₁₀ number of copies of bacteroides respect to controls has been previously found in chickens fed on diets containing PTS-O or FC (Peinado et al., 2013a,b). In line with these previous reports, very significant correlations were determined in the current work between bacteroides relative amounts and nutrient digestibility values in broiler ileal samples. This is also in agreement with previous work by Stanley et al. (2012) who found operational taxonomic units closely related to *Bacteroides fragilis* more abundant in better performing birds. Total bacteria in ileal or caecal contents of the birds correlated negatively with ileal N digestibility. Enhanced nutrients digestibility together with lower intestinal bacterial counts has been reported after antibiotics use (Dibner and Richards, 2005). However, as most of the N found in the intestine or faeces of animals fed vegetable-based diets may correspond to bacterial protein (Rubio, 2003), a negative correlation between total intestinal bacteria and N digestibility is likely to be linked to an increase in endogenous bacterial N.

In conclusion, the results here reported suggest that positive or negative correlations can be found between performance parameters and changes of defined bacterial groups of the intestinal microbiota of growing broiler chickens. Due to its obvious productive and health

implications, this line of research deserves closer attention and further work is already being carried out by our group.

Acknowledgements

This research has been supported by the Spanish MINECO (AGL2012-32894 and SAF2013-44021-R), MICIIN (SAF2008-02616 and SAF2010-15670) and by the FEDER and FSE funds from the European Union. ES-P is a 'Project of Excellence' Fellow (Junta de Andalucía, contract no. P06-AGR-02150) and MJP is a recipient of a JAEpredoc (CSIC) grant.

References

- Bjerrum, L.; Engberg, R. M.; Leser, T. D.; Jensen, B. B.; Finster, K.; Pedersen, K.,** 2006: Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science* 85, 1151–1164.
- Bourlinoux, P.; Koletzko, B.; Guarner, F. V.,** 2003: The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. *American Journal of Clinical Nutrition* 78, 675–683.
- Bry, L.; Falk, P. G.; Midtvedt, T.; Gordon, J. I.,** 1996: A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273, 1380–1383.
- Dibner, J. J.; Richards, J. D.,** 2005: Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84, 634–643.
- Fonseca, B. B.; Beletti, M. E.; da Silva, M. S.; da Silva, P. L.; Duarte, I. N.; Rossi, D. A.,** 2010: Microbiota of the cecum, ileum morphology, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 1756–1760.
- Gaggia, F.; Mattarelli, P.; Biavati, B.,** 2010: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141, S15–S28.
- Gerritsen, R.; van Dijk, A. J.; Rethy, K.; Bikker, P.,** 2010: The effect of blends of organic acids on apparent fecal digestibility in piglets. *Livestock Science* 134, 246–248.
- Gong, J.; Forster, R. J.; Yu, H.; Chambers, J. R.; Sabour, P. M.; Wheatcroft, R.; Chen, S.,** 2002: Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiology Letters* 208, 1–7.
- Gong, J.; Yu, H.; Liu, T. J.; Gill, J.; Chambers, J. R.; Wheatcroft, R.; Sabour, P. M.,** 2008: Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1372–1382.
- Kim, G.-B.; Seo, Y. M.; Kim, C. H.; Paik, I. K.,** 2011: Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science* 90, 75–82.

Peinado, M. J.; Ruiz, R.; Echávarri, A.; Rubio, L. A., 2012: Garlic derivative PTS-O is effective against broiler pathogens in vivo. *Poultry Science* 91, 2148–2157.

Peinado, M. J.; Ruiz, R.; Echávarri, A.; Aranda, I.; Rubio, L. A., 2013a: Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves performance in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 181, 87–92.

Peinado, M. J.; Echávarri, A.; Ruiz, R.; Suárez-Pereira, E.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Rubio, L. A., 2013b: Effects of inulin and di-D-fructose dianhydride-enriched caramels on intestinal microbiota composition and performance of broiler chickens. *Animal* 7, 1779–1788.

Pelicano, E. R. L.; Souza, P. A.; Souza, H. B. A.; Figueiredo, D. F.; Boiago, M. M.; Carvalho, S. R.; Bordon, V. F., 2005: Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Brazilian Journal of Poultry Science* 7, 221–229.

Phillips, M. L., 2009: Gut reaction: environmental effects on the human microbiota. *Environmental Health Perspectives* 117, A198–A205.

Rubio, L. A., 2003: Determination of diaminopimelic acid in rat feces by high-performance liquid chromatography using the Pico Tag method. *Journal of Chromatography B* 784, 125–129.

Ruiz, R.; Rubio, L. A., 2009: Lyophilization improves the extraction of PCR-quality community DNA from pig fecal samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 723–727.

Ruiz, R.; García, M. P.; Lara, A.; Rubio, L. A., 2010: Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine fecal microbiota in vitro. *Veterinary Microbiology* 144, 110–117.

Stanley, D.; Deman, S. E.; Hughes, R. J.; Geier, M. S.; Crowley, T. M.; Chen, H.; Haring, V. R.; Moore, R. J., 2012: Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, 1361–1369.

Stanley, D.; Hughes, R. J.; Moore, R. J., 2014: Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 4301–4310.

Torok, V. A.; Ophel-Keller, K.; Loo, M.; Hughes, R. J., 2008: Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 783–791.

Torok, V. A.; Hughes, R. J.; Mikkelsen, L. L.; Pérez-Maldonado, R. P.; Balding, K.; MacAlpine, R.; Percy, N. J.; Ophel-Keller, K., 2011: Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5868–5878.

Capítulo 4: Discusión General

Como ya se ha expuesto anteriormente, los aditivos alimentarios son productos empleados en alimentación con el principal propósito de mejorar la calidad y/o seguridad de los productos animales y para optimizar el rendimiento y estado sanitario de las explotaciones. La posibilidad de desarrollar poblaciones bacterianas resistentes a los antibióticos en las explotaciones animales llevó a la consabida prohibición de los AGP por parte de la UE y a un considerable aumento en el interés por la búsqueda de posibles moduladores de la microbiota digestiva alternativos a los AGP.⁶ Tanto la Organización Mundial de la Salud (WHO) como la Organización Mundial de la Salud Animal (WOAH) promueven que tanto a nivel agrícola como veterinario se reduzca el uso de los AGP para poder controlar de esta forma la multiplicación de bacterias resistentes (Aidara-Kane, 2012). Para algunos autores, ha empezado una nueva era en la producción avícola gracias a la aparición de los nuevos aditivos alimentarios, que pueden convertirse en armas poderosas para la mejora de la salud y el rendimiento productivo de las granjas de pollos, y consecuentemente para la mejora de la economía avícola (Dhama y col., 2014). Se requiere aún bastante investigación fundamental en este campo para entender qué ocurre en el GIT tanto en estado de salud como de enfermedad, teniendo en cuenta la complejidad que introducen los tres principales factores del ecosistema intestinal (hospedador-alimentación-microbiota) (Rubio y col., 2011; Ducatelle y col., 2015).

El uso de extractos de plantas constituye una de las alternativas al uso de AGP. Estos productos se consideran “naturales” y menos tóxicos que los AGP, por lo que para algunos autores son aditivos alimentarios ideales para las dietas de las aves destinadas al consumo humano (Hashemi y col., 2008; Khan y col., 2010; 2012). Sin embargo, la diversidad de los resultados observados en las diferentes revisiones bibliográficas muestra la dificultad que conlleva relacionar los efectos de los extractos de plantas con un determinado microorganismo o proceso fisiopatológico. Aunque existe un interés global en la suplementación con hierbas y derivados fitogenéticos, hay también cierta preocupación acerca del uso de sustancias no probadas y con dificultades de regulación.

Las plantas contienen una gran variedad de sustancias biológicas de estructura química muy diversa que pueden dar lugar a diferentes efectos debido a sus diversos mecanismos de acción. Uno de los efectos más relevantes de este tipo de aditivos se relaciona con la capacidad de modular la composición de la microbiota digestiva habitual y/o los recuentos de bacterias patógenas o potencialmente patógenas. La mejora de la capacidad digestiva del GIT podría considerarse un efecto indirecto de este mecanismo, contribuyendo a un mayor crecimiento (Windisch y col., 2008; Hashemi y Davoodi, 2010). Las bacterias intestinales toman la energía para desarrollarse y reproducirse de los compuestos de la dieta, por lo que ésta tiene un efecto directo sobre la composición de la población bacteriana del TGI (Craven, 2000; Apajalahti y col., 2004; Sun y col., 2013b). Por tanto, incluyendo en la dieta componentes específicos se puede teóricamente promover una modulación de la microbiota que afecte al desarrollo más favorable de ciertos grupos bacterianos considerados “beneficiosos” (Wu y col., 2004; Solís de los Santos y col., 2005; Oviedo-Rondón y col., 2006). Existen ciertas evidencias de que una mayor diversidad en la microbiota es beneficiosa en muchos niveles productivos, pero la relación causa-efecto no ha sido aún suficientemente fundamentada (Luo y col., 2013).

⁶ Ver Introducción, p 25.

Se necesita de investigaciones más exhaustivas para definir mejor tanto los efectos de los extractos de plantas sobre la microbiota, como el posible impacto de su uso sobre las producciones animales. Este conocimiento debería permitirnos el desarrollo de productos innovadores susceptibles de utilizarse para mejorar la producción animal sin comprometer la salud pública (Redondo y col., 2014).

En la última década, se han llevado a cabo numerosos estudios basados en la incorporación de productos derivados del ajo en dietas para aves, encontrándose con frecuencia efectos beneficiosos sobre la eficiencia alimentaria y el crecimiento en broilers (Aji y col., 2011; Mansoub y col., 2011; Pourali y col., 2010; Khan y col., 2012). No sólo se ha demostrado que estos productos poseen un potente efecto antimicrobiano, sino que además se ha visto que determinados productos de degradación del ajo pueden ejercer así mismo efectos significativos (Harris y col., 2001). Estos resultados positivos derivados de la suplementación con ajo o sus derivados pueden ser influidos por factores como la dosis, duración y procesado del producto junto a las condiciones experimentales, etc. (Khan y col., 2008). Parece claro, sin embargo, que aún se necesita realizar un trabajo más exhaustivo acerca de los mecanismos de acción de derivados o productos concretos, así como acerca de las dosis necesarias, duración del tratamiento, etc. para alcanzar una más eficaz utilización (Khan y col., 2012).

A partir de esta situación previa, en el trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha evaluado la utilidad en alimentación aviar de un derivado concreto y bien definido del ajo obtenido industrialmente (propil propano tiosulfonato, PTS-O). Para ello se han realizado una serie de ensayos *in vivo* para estudiar: i) el efecto de la incorporación a raciones para pollos broiler en crecimiento de diferentes concentraciones de PTS-O sobre algunas poblaciones de bacterias comensales, patógenas o potencialmente patógenas presentes en el tracto digestivo (Publicación 1; Poultry Science 91:2148-2157); ii) el efecto sobre parámetros productivos, fisiológicos y de aprovechamiento de nutrientes (Publicación 2; Animal Feed Science and Technology 181:87-92); y iii) la posible relación entre la composición de la microbiota digestiva y determinados parámetros productivos de las aves (Publicación 3; Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 99:418-423).

4.1. PTS-O modificó la composición de la microbiota digestiva en broilers

Como puede comprobarse en la publicación 1 (Poultry Science 91:2148-2157) la incorporación a la dieta de PTS-O tuvo un efecto antimicrobiano significativo *in vivo* contra las poblaciones de bacterias tanto patógenas (*Salmonella* spp, *C. jejuni*) como potencialmente patógenas (enterobacterias, *E. coli*). Los efectos parecen estar relacionados con la dosis administrada ya que el PTS-O suplementado en una concentración mayor (135 mg/Kg) fue más efectivo que la suplementación con la dosis de 90 mg/kg, mientras que esta última fue más efectiva que la dosis de 45 mg/Kg. El efecto más claro de adición de PTS-O sobre la población de *Salmonella* spp se dio en los contenidos ileales, mientras que en el resto de contenidos intestinales (buche y ciego) el efecto antimicrobiano más claro fue sobre enterobacterias y *E. coli*. En el caso de *C. jejuni* sólo la dosis más alta del aditivo (135 mg/Kg) tuvo un efecto antimicrobiano significativo. No hubo efecto sobre el número de copias de *C. perfringens* en ninguno de los casos y bajo ninguna dosis.

Esta información concuerda con los resultados referidos por Ruiz y col. (2010), quienes demostraron que los compuestos organosulfurados, entre los que se encontraba el aditivo de estudio en este trabajo, ejercían *in vitro* una clara actividad antimicrobiana frente a todos los grupos bacterianos estudiados, siendo enterobacterias y coliformes los grupos más afectados. También se observó un efecto bactericida frente a patógenos y potencialmente patógenos y más concretamente frente a *E. coli* y *Salmonella Typhimurium*. Si se considera la publicación 2 (Animal Feed Science and Technology 181:87-92), puede verse también un efecto sobre el número de copias de *Lactobacillus* spp, enterobacterias y *E. coli* en el buche con las dos dosis más bajas del aditivo (45 mg/Kg y 90 mg/kg). En los contenidos ileales bastó con la dosis de 45 mg de PTS-O/kg para producir una disminución en *Clostridium coccooides*⁷ - *Eubacterium rectale* y *Clostridium leptum*. Con la dosis mayor se observó un menor contenido de enterobacterias y un mayor número de bacteroides en este mismo tramo intestinal. En los contenidos cecales se afectan *E. coli* y bacteroides por el aditivo administrado, disminuyendo su número en la dosis de 90 mg/kg, mientras que el número de *C. coccooides* -*E. rectale* fue menor con la dosis inferior.

Tal y como se ha explicado anteriormente, la flora intestinal juega un papel muy relevante en el crecimiento y la salud en broilers, siendo mayor su influencia cuando los pollitos son pequeños y su microbiota todavía en proceso de desarrollo e implantación. Se considera que su función principal es constituir una barrera protectora y ocupar los sitios de anclaje del epitelio impidiendo o disminuyendo la adhesión de patógenos⁸. Algunos patógenos entéricos asociados con la microbiota intestinal son capaces de causar millones de pérdidas en el sector además de riesgos para la salud humana y animal. Podemos decir que las infecciones gastrointestinales pueden ser controladas en cierta medida mediante el uso de agentes antimicrobianos, aunque con la prohibición de los AGP este control se está dificultando. De todos los patógenos que pueden habitar el intestino de los broilers, *Salmonella* spp, *C. jejuni*, *C. perfringens* y *E. coli* son con diferencia las bacterias que más pérdidas e impacto sanitario causan. Por lo que se refiere a las especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, baste recordar que *Salmonella* spp y *Campylobacter* spp son la causa principal de gastroenteritis de etiología alimentaria en humanos.⁹ *E. coli*, por su parte, es un patógeno que despierta un interés particular para la industria aviar, particularmente con respecto a camas de pollos como reservorio potencial y vehículo de transmisión para patógenos constituyendo la mayor fuente de este tipo de bacteria (Forgetta, 2012). Con respecto a *Campylobacter* spp se han realizado verdaderos esfuerzos para reducir su prevalencia muy marcada en granjas, incluido el uso de ácidos orgánicos, aceites esenciales y sus derivados como el timol (Epps y col., 2015), el carvacrol (Arsi y col., 2014) y extractos de plantas (Kurekci y col., 2014). Con todo, se ha comprobado que es muy difícil realizar una intervención en el intestino de broilers capaz de reducir su colonización. *C. perfringens*, tras la prohibición de los AGP en 2006, ha experimentado un rebrote en los casos de enteritis necrótica en aves (Hafez, 2011).

En este contexto, los extractos de ajo han demostrado poseer actividad antimicrobiana contra poblaciones potencialmente patógenas (Lanzotti y col., 2014; Borlinghaus y col., 2014).

⁷ Actualmente *Blautia coccooides* (Liu y col., 2008)

⁸ Ver Introducción, p 51.

⁹ Ver Introducción, pp 55-57

Esta actividad antibacteriana del ajo se atribuye sobre todo a su principal tiosulfonato, la alicina¹⁰, pero también a otros compuestos (Figura 4.1). La alicina y los derivados del ajo han manifestado poseer un amplio espectro en cuanto a actividad microbiana se refiere, incluidos géneros bacterianos tales como *Escherichia* spp, *Salmonella* spp, y *Clostridium* spp (Uchida y col., 1975; Cellini y col., 1996). De acuerdo con Mallet y col. (2015), el aceite de ajo demostró *in vitro* actividad antimicrobiana frente a varios patógenos presentes habitualmente en los alimentos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Choleraesuis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum*, cuando se incluía en cantidades de 0,03 mg/ml. Los mismos resultados aportaron Mnayer y col. (2014) con *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* y *C. jejuni*. Así mismo, Kumar y col. (2010) indican que la suplementación en dieta de broilers con ajo a 250 ppm reduce los recuentos intestinales de *E. coli* y *Salmonella* spp. Hossain y col. (2014) aportan que la administración de ajo envejecido y fermentado demostró poseer actividad antimicrobiana ya que disminuyó el recuento de *E. coli* en el contenido cecal.

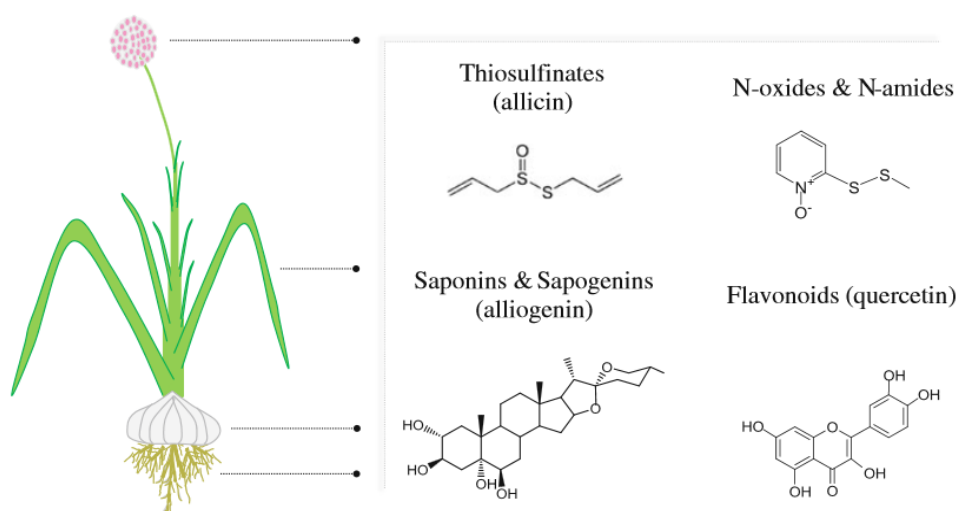


Figura 4.1. (Lanzotti y col., 2013). Representación esquemática de las sustancias químicas mayoritarias presentes en los componentes del género *Allium* con actividad antimicrobiana.

La principal dificultad en la interpretación de la mayoría de estos estudios reside en el hecho de que se habitualmente se han utilizado extractos, aceites, ajo molido, etc. Estos ingredientes constituyen mezclas complejas de muy diversas sustancias, por lo que es difícil adscribir los efectos a la presencia de un determinado compuesto. En nuestro caso, los efectos se han observado con dosis concretas del compuesto PTS-O, lo que permite adscribir el efecto a una sustancia definida y facilitar el estudio del mecanismo de acción de este tipo de sustancias. Diversos estudios en sistemas mamíferos han indicado que los organosulfurados actúan sobre multitud de rutas de señalización intracelulares (Kim y col., 2013). Aunque el mecanismo de acción del PTS-O aún se desconoce, podemos suponer que sea similar al de la

¹⁰ Ver Introducción pp 78-79.

alicina, la cual se ha comprobado que es capaz de ejercer su acción influyendo en numerosos procesos fisiológicos bacterianos.¹¹

4.2. PTS-O mejoró el rendimiento productivo y la digestibilidad de nutrientes y modificó la estructura histológica intestinal en broilers

Como puede verse en la publicación 1 (Poultry Science 91:2148-2157), se produjo un efecto positivo en cuanto al rendimiento productivo se refiere con la inclusión de PTS-O en raciones para broilers. Este efecto se refleja sobre todo en la disminución del índice de transformación para ambas dosis administradas (45 y 90 mg/Kg). Además la ganancia de peso para los pollos que tomaron la dosis más baja fue mayor. Sin embargo, la ingesta alimentaria no se vio afectada por la incorporación del aditivo a la dieta.

De acuerdo con la bibliografía, la suplementación con ajo de dietas para aves puede tener un impacto significativo sobre los índices productivos. Nuestros datos de ganancia de peso están en consonancia con lo observado por otros autores. Así, Bashar y Abubakar (2008) observaron que el ajo administrado en dosis de 150 mg/Kg promovía el crecimiento en pollos broiler. Jo y col. (2009) determinaron la influencia favorable del extracto de ajo en la eficiencia alimentaria. Aji y col. (2011) también observaron que la ganancia de peso en los pollos alimentados con ajo y cebolla fue mayor que en el caso de los pollos control. En un estudio realizado por Jimoh y col. (2014) la ganancia media de peso y el peso al sacrificio aumentaron en todos los grupos tratados con ajo, y Kumar y col. (2010) indican que la inclusión de ajo a 250 ppm aumentaba la ganancia de peso. Según Hossain y col. (2014), la dieta con ajo envejecido y fermentado dio lugar a un aumento en la ganancia de peso final. La suplementación dietética con cebolla (un alimento muy parecido al ajo tanto genética como funcionalmente) también ha sido estudiada en broilers. La administración de 30 g/kg de cebolla en el pienso aumentó la ganancia de peso (Goodarzi y col., 2014), y también cuando se administró en porcentajes de 1-2 % (Goodarzi y Nanekarani, 2014). Así mismo, An y col. (2015) demostraron que el rendimiento productivo en pollos alimentados con dietas conteniendo 0.3-0.5 % de extracto de cebolla fue mayor que en el grupo control. Las posibles causas de este incremento se discuten más adelante.¹²

Por otra parte, la suplementación con PTS-O no modificó la ingesta alimentaria. La información bibliográfica en relación con este aspecto es controvertida. Así, Slyranda y col. (2011) sugieren que el efecto de la suplementación con ajo sobre el rendimiento productivo en broilers no es sólido, y Demir y col. (2003) y Pourali y col. (2010) sugieren lo mismo en estudios donde se emplean concentraciones de ajo entre 0,2-1,0 %. De acuerdo con Hossain y col. (2014), la administración en la dieta de ajo envejecido y fermentado no dio lugar a una mejora en la ingesta diaria de los animales.

Esta diversidad de resultados puede deberse a razones como la desigual naturaleza de los derivados del ajo empleados, las concentraciones de sus componentes activos, así como a la compleja química del ajo (Jimoh y col., 2014). Estos últimos autores también han observado que las dietas que sobrepasan niveles de ajo por encima de 150 mg/Kg interfieren con la

¹¹ Ver Introducción pp 78-79.

¹² Ver pp 142,143,144,145.

absorción y digestión de nutrientes en pollos. De acuerdo con Ramiah y col. (2014), el aumento de la ganancia de peso puede ser debido al componente aromatizante y palatable del ajo que incrementa el consumo de pienso. La efectividad del ajo administrado como suplemento en la dieta fue dosis-dependiente, contrariamente a lo que apuntan Jimoh y col. (2014), quienes sugieren que generalmente el ajo causa una fuerte disminución en la ingesta alimentaria con un efecto significativo a un nivel de suplementación de 100 mg/Kg. La disminución del consumo de pienso que se ha visto en las dietas suplementadas con ajo podría estar relacionada con la poca aceptabilidad del aditivo debida al fuerte olor que desprende debido a la presencia de ácidos grasos volátiles que poseen un aroma desagradable. Javandel y col. (2008) y Ademola y col. (2009) observaron igualmente que el suplemento de ajo en la dieta proporcionada a los broilers en valores superiores a 2,5% de ajo afectaba de manera adversa a la ganancia de peso.

De acuerdo con Rahman (2007) la funcionalidad de los derivados del ajo que son empleados para sustituir a los AGP depende en gran parte de la estabilidad y conservación de su componente más importante, la alicina, ya que sus propiedades se ven alteradas cuando es sometida a diferentes temperaturas, pH, procesos físicos de ruptura del ajo en sí o maceración y sometimiento a la acción de diferentes compuestos de naturaleza ácida u orgánica. Por tanto, la gran controversia que existe en la bibliografía sobre los efectos de estos compuestos en el rendimiento productivo podría aclararse mediante el estudio de la naturaleza y actividad físico-químicas de estos derivados. Trio y col. (2014) avalan esta teoría demostrando que la existencia y efectos de los constituyentes bioactivos del ajo varían en función de su modo de preparación y extracción. Por ejemplo, durante el procesado del ajo, en actividades como el corte o la extracción manual, un gran número de componentes organosulfurados se liberan en un corto período de tiempo. Las diferencias en cuanto a la presencia de los diferentes compuestos organosulfurados en el ajo intacto, y en los productos derivados del ajo que ha sido cocinado o procesado se consideran las principales razones para explicar esta controversia en los diferentes estudios. Las diferentes formas de preparación de los derivados del ajo, sus procedimientos de extracción, la concentración a la que se encuentran y la duración del tratamiento que se aplica contribuyen a complicar aún más el problema. A esto hay que añadir que los diferentes componentes del ajo poseen distintas acciones biológicas según el organismo que se trate. Para solventar todos estos problemas podrían tratarse de estandarizar las condiciones de preparación del ajo para la obtención de los derivados organosulfurados (Trio y col., 2014). Como ya se ha indicado, en nuestro caso se ha empleado un compuesto definido, estable y bien caracterizado químicamente (Ruiz y col., 2010).

En la publicación 1 (Poultry Science 91:2148-2157) se observa así mismo una modificación de la estructura histológica intestinal del intestino delgado en aves alimentadas con PTS-O a una dosis de 90 mg/Kg. La altura, anchura y área superficial de las vellosidades, junto al grosor de la mucosa y el grosor de la capa muscular aumentaron en relación con los controles.

Como sabemos, el desarrollo y estructura del GIT juegan un papel fundamental en la digestión y absorción de nutrientes requerida para el mantenimiento y el crecimiento de las aves (Uni y col., 1999). La altura de las vellosidades intestinales en broilers se considera un indicador muy importante en relación con el desarrollo del tracto gastrointestinal y la salud del

animal, así como en la digestión y absorción de nutrientes (Wang y Peng, 2008; Shamoto y Yamauchi, 2000). Un aumento en la longitud de las vellosidades intestinales da lugar a un aumento en la absorción de nutrientes debido a un aumento en la superficie de absorción como consecuencia de un desarrollo más saludable del intestino (Olukosi y Dono, 2014).

Efectos similares a los nuestros se han demostrado utilizando otros aditivos. Así, en un estudio en el que se emplea extracto de ajo (Purwanti y col., 2014) se observó un aumento significativo en la altura de las vellosidades intestinales del duodeno de broilers. El aumento de la longitud y anchura de las vellosidades en respuesta a la suplementación con ciertos aditivos tales como ácido benzoico y cúrcuma (*Curcuma longa*) (Olukosi y Dono, 2014), es indicador de que se produce una mejora en la morfología intestinal (Murakami y col., 2007; Rehman y col., 2007). La adición de una mezcla de aceites esenciales aumentó la altura de las vellosidades intestinales del yeyuno a los 21 y 42 días de edad en pollos broiler (Bozkurt y col., 2012), al igual que la adición de un aceite esencial del clavo (eugenol) (Mohammadi y col., 2014; Zhu y col., 2014). Sharifi y col. (2013) demuestran que la inclusión de un complejo multienzimático aumentó el área superficial de las vellosidades del íleon y por tanto, su capacidad absorptiva. Khoramabadi y col. (2014) prueban de manera similar cómo la adición de xilanasa y vitamina A da lugar al mismo resultado en todos los tramos del intestino delgado. La suplementación con MOS tuvo un efecto parecido en íleon y yeyuno en broilers criados bajo condiciones subóptimas (Pourabedin y col., 2014). Barbosa y col. (2011) concluyeron lo mismo en condiciones normales en el íleon. De manera similar ocurre en el ciego cuando se incluye un probiótico en las dietas o una mezcla probiótica de varias cepas bacterianas en el duodeno, yeyuno e íleon (Tsirtsikos y col., 2012 y Sharifi y col., 2012 respectivamente).

Con respecto a la digestibilidad y absorción de nutrientes, los resultados de esta tesis muestran que la suplementación con PTS-O en raciones para broilers tuvo un efecto positivo. En la publicación 2 (Animal Feed Science and Technology 181:87-92) puede verse como la AMEn y la digestibilidad fecal de energía, N, grasa, fibra y NSP fueron mayores que los controles en pollos alimentados con PTS-O.

Es conocida la limitada capacidad de las aves para la digestión de los NSPs. Así, está demostrado que los complejos formados por arabinosa y xilosa solubles en agua son los principales factores antinutritivos de los NSP en dietas basadas en trigo como la utilizada en nuestros ensayos, ya que aumentan la viscosidad del contenido intestinal, provocan la pérdida de nutrientes, modifican la composición de la microbiota del GIT e interfieren en el proceso de digestión y la absorción de nutrientes (Choct y Annison, 1992a; Choct y col., 1996). De acuerdo con Slominski y col. (2011), los NSP son los componentes principales de la fibra dietética en las dietas empleadas para aves. Estos componentes comprenden celulosa y polisacáridos no celulósicos, estos últimos en gran parte solubles en agua, como los β -glucanos y los arabinoxilanos, que interfieren con la mezcla digestiva de nutrientes y enzimas, dificultando el movimiento del contenido intestinal y el transporte de los productos procedentes de la hidrólisis a la mucosa intestinal, lo cual puede conllevar la disminución en la absorción y en el rendimiento productivo (Graham y Aman, 1991). PTS-O podría estar facilitando la degradación de NSP al favorecer el crecimiento de bacterias capaces de degradar fracciones fibrosas (Ruiz y col., 2015a). Se conocen diversos mecanismos que capaces de influir en la funcionalidad intestinal en broilers, incluyendo el tiempo de tránsito, las secreciones digestivas y la mejora

de las actividades de las enzimas digestivas, así como la combinación de sus efectos (Puvaca y col., 2013). La importancia de las dinámicas digestivas del almidón y las proteínas en el rendimiento productivo de los pollos broiler ha sido estudiada por numerosos autores (Weurding y col., 2003a; Weurding y col., 2003b y Liu y col., 2013). De acuerdo con Liu y col. (2014), existe una relación entre la digestibilidad del nitrógeno y el índice de transformación. Esta relación sugiere que la eficiencia de transformación alimentaria puede mejorarse mediante la manipulación de los índices digestivos proteicos, argumento que se demuestra en el estudio desarrollado por Kalmendal y Tauson (2012) en el cual se prueba que tanto el índice de transformación como la digestibilidad aparente de grasa y AMEn se ven mejoradas con la suplementación de enzimas como xilanasas y proteasas en dietas para broilers.

A pesar de que la suplementación dietética de PTS-O es capaz de mejorar la estructura histológica intestinal (publicación 1, Poultry Science 91:2148-2157), no se observaron efectos sobre las actividades enzimáticas de sacarasa, maltasa, isomaltasa, aminopeptidasa, y fosfatasa alcalina en las muestras de mucosa ileal entre los pollos alimentados con la dieta control y aquellos que tomaron la dieta con el aditivo PTS-O (publicación 2: Animal Feed Science and Technology 181:87-92). Otros autores sugieren que las diferencias en los recuentos bacterianos del intestino en broilers o las mejoras en la morfología de la mucosa intestinal pueden estar acompañadas (Sun y col., 2013a; Tang y col., 2014a; Zhu y col., 2014; Quiao y col., 2015) o no (Shakouri y col., 2009) por variaciones en las actividades de las enzimas intestinales.

4.3. Posibles relaciones entre los valores de los índices productivos y la composición de la microbiota digestiva en broilers

En la publicación 3 (Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 99: 418-423) se ha avanzado una primera aproximación a esta cuestión. Utilizando los datos obtenidos en estudios previos, donde se han medido parámetros productivos y microbiológicos, hemos estudiado una serie de correlaciones. Así, se observó una correlación positiva entre las proporciones de *C. coccoides-E. rectale* en los contenidos del buche y el crecimiento de los pollitos (ganancia de peso y peso final de los mismos). Mientras que la digestibilidad fecal de la grasa tendía a una correlación positiva con la cantidad relativa de *C. coccoides-E. rectale* ($C. coccoides-E. rectale / \text{bacterias totales}$) en el contenido del buche, la cantidad relativa de enterobacterias (enterobacterias/bacterias totales) tendía a correlacionar negativamente con la digestibilidad fecal de la grasa y de la fibra. Igualmente, las proporciones de *Escherichia-Shigella* ($Escherichia-Shigella / \text{bacterias totales}$) mostraron correlaciones negativas con la ganancia de peso de las aves y hubo una tendencia hacia correlaciones negativas con el peso final. La digestibilidad ileal del nitrógeno mostró una correlación negativa con los recuentos de bacterias totales en los contenidos cecales de las aves. La cantidad relativa de bacteroides (bacteroides / bacterias totales) en los contenidos ileales mostró una correlación positiva con la digestibilidad fecal de fibra, hemicelulosa y celulosa, y tendió hacia correlaciones positivas con la digestibilidad fecal de energía, nitrógeno y grasa. La digestibilidad ileal del nitrógeno evidenció una correlación negativa con los recuentos de bacterias totales en los contenidos ileales de los pollos. Además, se ha encontrado una tendencia hacia correlaciones positivas entre las cantidades relativas de *Lactobacillus* spp ($Lactobacillus / \text{bacterias totales}$) y ganancia de peso y peso final en broilers tan sólo en contenidos cecales. No se ha determinado una

correlación significativa entre los recuentos relativos de *Lactobacillus* spp en los contenidos del buche o del íleon y el crecimiento o la digestibilidad de nutrientes.

En línea con los resultados de los otros dos trabajos, en esta publicación se han determinado correlaciones muy significativas entre las cantidades relativas de bacteroides y los valores de digestibilidad de nutrientes en muestras de contenido ileal. De hecho, se muestra una correlación estadísticamente significativa entre la digestibilidad de la fibra y los NSP y los recuentos relativos de bacteroides en íleon. De acuerdo con la bibliografía y los resultados expuestos en los tres trabajos, se puede hablar hipotéticamente de que un descenso en el recuento de algunos grupos bacterianos intestinales como enterobacterias, y probablemente *Lactobacillus* spp, acompañados por un incremento en otros como bacteroides, podría estar relacionado con incrementos en el rendimiento productivo en aves. Un aspecto importante que se debe tener presente es que los resultados pueden ser diferentes de acuerdo con las diferentes secciones intestinales estudiadas. Nuestros datos sugieren que es importante considerar con cuidado qué tipo de muestras (buche, íleon, ciego, heces) se han usado para estudiar las posibles relaciones entre los recuentos relativos bacterianos y los parámetros productivos en pollos, ya que los resultados pueden llevar a conclusiones muy diferentes. Hay que advertir además de que la existencia de una determinada correlación positiva no implica necesariamente una relación positiva causa-efecto entre la(s) proporción(s) de una determinada especie o grupo bacteriano y determinados parámetros productivos o de digestibilidad. Con todo, sí pueden ser indicativos de determinadas tendencias e indicar posibles pistas de investigación.

En este sentido, pueden plantearse diferentes estrategias experimentales para abordar el estudio de las relaciones entre los valores de los índices productivos y la composición de la microbiota digestiva en broilers. Una posibilidad es el estudio de la microbiota en aves alimentadas con raciones suplementadas con determinados productos activos como enzimas. Así por ejemplo, Torok y col. (2011a) identificaron y caracterizaron cambios en la microbiota del intestino en respuesta a enzimas o agentes antimicrobianos administrados en la dieta, cambios que fueron acompañados de otros en el rendimiento productivo de los pollos. Este tipo de aproximación es problemática a este respecto ya que lo más probable es que los cambios en la composición de la microbiota sean consecuencia de modificaciones en la disponibilidad de nutrientes debido al efecto de las enzimas. A su vez, los efectos sobre parámetros productivos pueden ser consecuencia de una mejor absorción intestinal. Sin embargo, la cuestión que nos planteamos es si modificaciones en la composición de la microbiota son capaces de dar lugar a modificaciones en los parámetros fisiológicos y/o productivos. Por tanto, el mejor modelo sería en principio aquel cuyo efecto primario recayera en la modulación de la composición microbiana intestinal. Aunque con la información de que disponemos en este momento no se puede descartar un posible efecto del PTS-O derivado de otros mecanismos, incluyendo su absorción intestinal, este aditivo, de acuerdo con nuestra información previa (Ruiz y col., 2010), tiene un efecto antimicrobiano específico.¹³

En relación con esto, algunos estudios se han centrado en el estudio de la microbiota de líneas genéticas de pollos con diferentes rendimientos productivos con la intención de

¹³ Ver Introducción, p 84.

identificar qué miembros de cada comunidad microbiana eran más abundantes en cada caso (Stanley y col., 2014). Se ha detectado en este sentido microbiota diferencial en heces (Singh y col., 2012), íleon (Torok y col., 2011b) y ciego (Torok y col., 2011b; Stanley y col., 2012). Torok y col. (2011b) y Singh y col. (2012) observan que una mejora del rendimiento productivo en broilers puede estar relacionada con la presencia de especies bacterianas beneficiosas o perjudiciales. De acuerdo con Rinttilä y Apajalahti (2013) existe una alta correlación entre la estructura que posee la comunidad microbiana cecal y la eficiencia energética del pollo, ya que con una composición microbiana determinada el animal es capaz de extraer energía de la dieta de manera más eficiente dando lugar a un mejor índice de transformación. Se ha comprobado que ciertos grupos bacterianos (*Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, y *Veillonellaceae*) son los que habitualmente se repiten cuando se produce una situación de mantenimiento o promoción del rendimiento productivo (Torok y col., 2011a; Rinttilä y Apajalahti., 2013). Se considera que la microbiota digestiva es capaz de afectar al crecimiento y productividad animales ya que es capaz de reducir la utilización dietética de energía cuando se producen situaciones de estrés y también interviene en el metabolismo energético que tiene lugar en el pollo (Muramatsu y col., 1994). De acuerdo con Singh y col. (2013) la relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), los filos dominantes en la microbiota del GIT¹⁴, puede jugar un importante papel en la absorción nutritiva y en última instancia en el aumento de la ganancia de peso corporal, por lo que la manipulación de la microbiota intestinal podría modular el peso corporal en broilers. La relación F/B puede emplearse como indicador potencial tanto para monitorizar la microbiota intestinal como un factor para controlar el rendimiento en el crecimiento de los pollos. En este estudio se demuestra que su incremento lleva a mejoras en el rendimiento productivo, aumentando mayoritariamente el número de bacterias pertenecientes al género *Clostridiaceae*. Sin embargo, se ha documentado que un alto rendimiento productivo del pollo puede obtenerse en una amplia variedad de composiciones microbianas (Geier y col., 2009). Por tanto, es claro que no contamos por el momento con información suficiente para fundamentar la relación entre las variaciones de la composición microbiana y los parámetros productivos y/o fisiológicos.

Los numerosos estudios llevados a cabo en las últimas décadas con los AGP son probablemente el ejemplo mejor estudiado en cuanto a la posible relación entre composición de la microbiota digestiva y otros parámetros fisiológicos en animales que consumen alguna sustancia cuyo principal efecto se relaciona con la composición de esta microbiota. Como ya se ha explicado¹⁵ la modulación de la composición de la microbiota digestiva por parte de los AGP puede dar lugar a modificaciones fisiológicas y productivas principalmente por sus efectos sobre: i) la digestibilidad de nutrientes; ii) la estructura intestinal; iii) las proporciones de bacterias patógenas o potencialmente patógenas; iv) el sistema inmune. Utilizando como pauta la información existente sobre AGP, a continuación haremos una descripción de estas posibles relaciones con referencia sobre todo a los resultados obtenidos con el aditivo aquí estudiado (PTS-O).

i) Efectos sobre la digestibilidad de nutrientes

¹⁴ Ver Introducción, p 53

¹⁵ Ver Introducción, pp 69-72

Como se ha indicado anteriormente, la inclusión de PTS-O en las raciones para broilers dio lugar a un incremento en la digestibilidad de nutrientes (Animal Feed Science and Technology 181:87-92). Se ha descrito que las bacterias del subgrupo *C. coccooides* perteneciente al grupo *Eubacterium rectale* y otras bacterias productoras de butirato, promueven la salud intestinal a través de la proliferación y del recambio celular en el colon actuando en la prevención y mejora de ciertas enfermedades intestinales como el síndrome de colon irritable o la colitis ulcerosa (Van den Abbeele y col., 2013). Estos grupos bacterianos son además capaces de degradar una compleja variedad de polisacáridos en el GIT de humanos y animales (El Kaoutari y col., 2013; Cockburn y col., 2015). Una situación similar se ha comprobado en especies pertenecientes a la familia de los Bacteroidaceae, las cuales están involucradas en actividades metabólicas relevantes, incluida la fermentación de los carbohidratos, la inducción de enzimas glucolíticas en los enterocitos, la utilización de sustancias nitrogenadas, la biotransformación de ácidos biliares y la prevención de la colonización por patógenos en cerdos (Ivarsson y col., 2014). En este mismo trabajo se refiere una mejora en la digestibilidad de NSP y fibra dietética relacionada en los contenidos ileales de cerdos en crecimiento relacionada con la abundancia de *Bacteroides* spp, lo que sugiere que las bacterias pertenecientes a este género pueden estar implicadas en la degradación de los compuestos fibrosos presentes en el contenido intestinal. Baer y col. (2014) relacionan el aumento de *Bacteroides* en el intestino con una menor excreción de nitrógeno y carbohidratos en el hombre adulto.

Por tanto, la microbiota digestiva puede tener una gran influencia en la absorción y digestibilidad de nutrientes por su efecto sobre la digestibilidad de los NSP, ya que un descenso en la cantidad de NSP presentes en el intestino habitualmente deriva en un aumento en la digestibilidad de nutrientes y la AMEn (Murphy y col., 2009; Olukosi y Adeola, 2010; Ball y col., 2013; Kianfar y col., 2013; Ravindran y col., 2014). La razón es que la presencia de determinadas proporciones de NSP puede inhibir la absorción de proteínas, grasa y almidón (Kianfar y col., 2013). Una mayor viscosidad en los contenidos intestinales producida por un exceso de NSP solubles disminuye el índice de difusión de los sustratos y enzimas digestivas y reduce su interacción en la superficie de la mucosa intestinal, pudiendo además proporcionar un mayor sustrato para patógenos potenciales (Wang y col., 1992; Almirall y col., 1995). En este sentido, en estudios recientes llevados a cabo en nuestro grupo (Ruiz y col., 2015a) hemos comprobado que existen ciertas familias bacterianas como *Clostridiaceae 1*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Micrococcaceae*, identificadas por T-RFLP, que están implicadas tanto en definir la composición de la microbiota cecal de pollitos en crecimiento como en establecer diferencias en los parámetros productivos. Ciertos grupos bacterianos presentes en el intestino de pollos han demostrado tener importantes propiedades bioquímicas relacionadas con la degradación de sustancias. *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus bovis*, y *Bacteroides* spp tienen actividad degradando NSP encontrados en el grano (Beckmann y col., 2006).

En este contexto conviene hacer una referencia al género *Lactobacillus*. Aunque este grupo se considera habitualmente como beneficioso, ha sido implicado también en la depresión del crecimiento en broilers debido a la competencia por la ingesta de nutrientes, o a una menor absorción de la grasa relacionada con la falta de conjugación de los ácidos biliares. Así, Lin (2014) indica que la acción promotora del crecimiento de los AGP se debe en parte a la

reducción de la actividad de la hidrolasa de las sales biliares (BSH), lo que favorecería una mayor absorción de las grasas.¹⁶ La razón aducida es que los AGP reducen de manera significativa la población de las especies del género *Lactobacillus*, a las que se considera las principales productoras de la BSH en el intestino delgado (Begley y col., 2006). Por todo ello, se ha sugerido que las sustancias que actúan como AGP y mejoran la ganancia de peso pueden tener una acción similar a los AGP reduciendo las poblaciones de *Lactobacillus* spp (Wang y col., 2012; Lin, 2014).

ii) Efectos sobre la estructura histológica intestinal

La utilización de PTS-O en las raciones para broilers dio lugar a modificaciones en la estructura histológica intestinal (Poultry Science 91:2148-2157). La estructura e integridad del epitelio intestinal son factores muy importantes en relación con la salud intestinal, y por tanto con su capacidad digestiva. La altura de las vellosidades se reconoce como un buen indicador de la función y activación de las vellosidades intestinales debido a una mayor capacidad de absorción del intestino delgado (Shamoto y Yamauchi, 2000; Montagne y col., 2003). Por otra parte, la mucosa del GIT juega un papel fundamental ya que constituye una barrera defensiva frente a los antígenos que proceden de los microorganismos y la dieta. A su vez, como ya se ha indicado,¹⁷ la regulación inmuno-fisiológica del intestino depende en gran medida de la composición de la microbiota habitual, por lo que un balance adecuado de la misma favorecerá una adecuada permeabilidad intestinal y una mejor respuesta frente a una situación de estrés o una invasión patógena evitando el daño en las vellosidades y criptas intestinales. Además de la microbiota, el moco procedente de las células caliciformes que recubre la superficie epitelial del GIT, constituye una importante barrera física que actúa contra el anclaje de antígenos lumenales. En un estudio desarrollado por Lei y col. (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* mejora esta estructura y resulta en una mejor superficie de absorción, ya que se produce un incremento en la altura de las vellosidades intestinales del íleon comparada con los pollos control. La inclusión dietética de *B. subtilis* ejerce una mejora de las características de la morfología de la mucosa intestinal aumentando la altura de las vellosidades del íleon y del duodeno y también el área superficial y el área absorptiva de las células epiteliales (Al-Fataftah y Abdelqader, 2014). Song y col. (2014) mostraron que la suplementación en la dieta de broilers con una mezcla de probióticos aumentó la altura de las vellosidades en el yeyuno. Choi y col. (2013) mostraron que un péptido antimicrobiano provocó una mayor altura de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon. Salim y col. (2013) expresaron resultados muy parecidos en broilers a los que se administraron microorganismos alimentarios directos (DFM) en la dieta. Resultados similares se han conseguido con la administración de un probiótico múltiple (Kim y col., 2012b) e inulina (Nabizadeh, 2012; Sen y col., 2012). Chae y col. (2012) demostraron que la suplementación con *B. subtilis* y la de una mezcla probiótica compuesta por *L. acidophilus*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae* en raciones para broilers mostró un incremento en la altura de las vellosidades en diferentes secciones del GIT. Resultados similares obtuvieron Rajput y col. (2013) mediante con la suplementación dietética con cúrcuma (*Curcuma longa* L.).

iii) Efectos sobre las proporciones de las bacterias patógenas o potencialmente patógenas

¹⁶ Ver Introducción, p 71

¹⁷ Ver Introducción, p 51

De acuerdo con Gaggia y col. (2010) y Williams y col. (2001), los principales efectos de los aditivos alimentarios que pretenden sustituir a los AGP deberían centrarse en mejorar la resistencia a la colonización por bacterias patógenas y aumentar la respuesta inmune de la mucosa del huésped, lo cual resulta en una menor presencia de patógenos, una mejora en el estatus sanitario de los animales y un riesgo reducido de patógenos en los alimentos que causan enfermedades entéricas. Aunque se conoce que la población bacteriana que se asocia a la superficie del intestino difiere de manera significativa de la que se encuentra en los contenidos intestinales, su interés reside en que está muy próxima al huésped y ejerce un efecto directo sobre el control de patógenos y el desarrollo del sistema inmune (Collado y Sanz, 2007; Stanley y col., 2014). La microbiota intestinal juega un papel crucial en la regulación de los mecanismos que permiten a las superficies de la mucosa el control de ciertas bacterias dañinas y también la respuesta adecuada a los patógenos microbianos invasores.

En este sentido, Jimoh y col. (2014) indican que existe un efecto positivo de la administración de ajo como aditivo en las dietas de broilers con respecto a la disminución en la población de *C. perfringens*. Goodarzi Boroojeni y col. (2014b) por su parte observaron que la administración de ácidos orgánicos en la dieta disminuyó la población de enterobacterias, y Mohammadi y col. (2014) observaron que la administración de aceite esencial de clavo (eugenol) dio lugar a una disminución en los recuentos de *E. coli*. Los DFM desempeñan un buen papel respecto a la protección frente a bacterias patógenas cuando se administran en dietas para broilers. En un estudio realizado por Lei y col. (2015), *Bacillus amyloliquefaciens* dio lugar a una reducción en el número de copias de *E. coli* en las muestras cecales de los pollos alimentados con la dieta suplementada. La inclusión dietética de *B. subtilis* ayuda en el mantenimiento de un adecuado balance microbiano intestinal (Al-Fataftah y Abdelqader, 2014). Salim y col. (2013) expresaron resultados muy parecidos en broilers a los que se administró DFM en la dieta, disminuyendo el contenido cecal de *E. coli*. Resultados similares se han conseguido con la administración de un probiótico múltiple (Kim y col., 2012b) e inulina (Nabizadeh, 2012; Sen y col., 2012). Chae y col. (2012) demostraron que la suplementación con *B. subtilis* y la de una mezcla probiótica compuesta por *L. acidophilus*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae* en raciones para broilers mostró un descenso en el recuento de coliformes del ciego.

Además del PTS-O, en nuestro grupo hemos estudiado otros aditivos como los dianhídridos de difructosa tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, hemos comprobado (datos no publicados) que estos aditivos son metabolizados selectivamente *in vitro* por especies de *Lactobacillus* (*L. reuteri* y *L. plantarum*). Este mismo aditivo fue probado en un ensayo *in vitro* e *in vivo* (Peinado y col., 2013b), observándose *in vitro* un aumento de lactobacilos, bifidobacterias, bacteroides y clostridios comparados con los pollos control, mientras que descendieron los recuentos de coliformes y enterobacterias. *In vivo*, lactobacilos y bifidobacterias no experimentaron cambios significativos pero se evidenciaron estos cambios en enterobacterias y bacterias de las especies *Escherichia-Shigella* en contenidos cecales y de buche. Por otra parte, este caramelo (Ruiz y col., 2015b) incrementó los recuentos de *C. coccoides* / *E. rectale* en la mucosa ileal de las aves. La información de que disponemos en este momento sugiere que el caramelo resiste en cierto nivel a la digestión intestinal de los pollos, es capaz de ser fermentado *in vitro* por la microbiota cecal y estimula de manera selectiva el crecimiento de bacterias asociadas a la salud y bienestar *in vitro*, disminuyendo el recuento de bacterias potencialmente patógenas *in vivo*, por lo que se comportaría como un prebiótico.

Estos cambios en las proporciones de bacterias patógenas o potencialmente patógenas se vieron acompañados de incrementos en la digestibilidad de nutrientes y en el crecimiento. Por tanto, la modificación de la microbiota patógena o potencialmente patógena, tanto por medio de agentes como el PTS-O, que actuaría como antimicrobiano, como de otras sustancias con efecto pre- o probiótico, pueden dar lugar a incrementos productivos en broilers.

Ensayos recientes de nuestro grupo (Ruiz y col., 2015b) han evidenciado un aumento significativo en el número y en la composición de *Bifidobacterium* spp con respecto a los controles en la mucosa ileal de los pollos alimentados con la dieta suplementada con PTS-O. Por tanto, este compuesto es capaz de producir cambios en la composición de la microbiota también a nivel del tisular. Se sabe que las bifidobacterias son capaces de ejercer un papel protector contra los patógenos ya que producen agentes antimicrobianos y/o bloquean la adhesión de patógenos, promueven la integridad del intestino y modulan la respuesta inmune del hospedador (Pokusaeva y col., 2011). Por tanto, el PTS-O puede ser capaz de mejorar y modular de manera significativa la composición de las bifidobacterias asociadas a la mucosa, lo cual podría mejorar la resistencia a la colonización por bacterias patógenas y mejorar la inmunidad de la mucosa, disminuir la carga de patógenos y mejorar el estatus sanitario de broilers (Yegani y Korver, 2008; Gaggia y col., 2010). Un aspecto a destacar es que algunos de los patógenos más importantes a nivel aviar que están implicados en zoonosis humanas, como por ejemplo *Campylobacter jejuni*, colonizan principalmente la mucosa intestinal de los pollos (Humphrey y col., 2014), y además tanto este patógeno como otros relacionados estrechamente con él son capaces de interactuar con la microbiota intestinal propia de cada animal (Sofka y col., 2015). Por tanto, aditivos como PTS-O capaces de ejercer un efecto a nivel tisular pueden ser efectivos frente a este tipo de patógenos.

iv) Efectos sobre el sistema inmune

Aunque nuestro trabajo en aves no incluye hasta el momento actual datos acerca de parámetros inmunológicos, Kim y col. (2013) muestran un efecto positivo de ambos derivados del ajo (PTS-O/PTS) sobre los parámetros de inmunidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Ambos compuestos aumentaron la proliferación de células del bazo y disminuyeron la viabilidad de los esporozoitos de *Eimeria acervulina*. *In vivo* los resultados fueron similares ya que los pollos que siguieron la dieta suplementada y que fueron infectados por este protozoo tuvieron una mayor ganancia de peso, redujeron la excreta de ooquistes derivados de la infección y mejoraron el perfil de anticuerpos comparados con los pollos que tomaron la dieta control. Con respecto a los linfocitos intraepiteliales intestinales, vieron sus niveles afectados por la inclusión de los aditivos en la dieta, con respecto a los controles. Estos linfocitos (principalmente Natural Killers y linfocitos T) son de gran importancia ya que están asociados al tejido linfoide del intestino y se encargan de reconocer y destruir patógenos que amenazan la integridad del epitelio intestinal como es el caso de una coccidiosis. Por tanto, PTS-O podría tener influencia no sólo sobre la microbiota patógena sino también sobre la funcionalidad de los linfocitos intestinales en determinadas parasitosis en pollos.

Por su parte, Mansoub y Nezhadi (2011) demuestran que la suplementación con polvo de ajo en la dieta de broilers mejora su rendimiento productivo y también inmunitario, al igual que Liao y col. (2015) cuando adicionan *Clostridium butyricum* y Roul y col. (2013) y Kumar y

col. (2013) cuando adicionan otros agentes probióticos. Forder y col. (2007) describieron como se detectaba un perfil de mucina diferente y un mayor número de células epiteliales en el intestino de pollitos broiler criados de manera convencional cuando se comparan con broilers criados bajo condiciones libres de gérmenes. Estos cambios inmunes en la mucosa se entienden debido a la desigual colonización bacteriana en aves criadas en diferentes condiciones. Las alteraciones en el número de células linfocitarias y las diferencias en el tejido linfoide de estos dos tipos de pollos también han sido descritas (Honjo y col., 1993). Mwangi y col. (2010) encontraron que la diversidad de la microbiota intestinal tuvo un efecto importante en la complejidad de repertorio del receptor de células T sobre estas células tanto en el intestino como en el bazo.

En las últimas décadas, la selección genética intensiva en las aves ha provocado la alteración del sistema inmune de los pollos modernos, y las prácticas comerciales de crianza pueden intensificar la exposición a organismos patógenos. Por tanto, la inmunomodulación nutricional puede suponer un procedimiento útil para la producción eficiente de los pollos sanos. El sistema inmune está formado por un componente adquirido y otro innato y ambos son importantes para mantener la salud aviar, pero los factores que aumenten la actividad de uno de ellos darán lugar a menudo a la disminución de la actividad del otro. Además, la respuesta inmune innata lleva consigo el desarrollo de la inflamación y ésta puede reducir el rendimiento productivo, por lo que esta modulación nutricional podría emplearse para reducir los efectos supresores del crecimiento de la activación de este sistema, para lo que se requiere un mejor conocimiento del funcionamiento del sistema inmune aviar (Korver, 2012). La mucosa intestinal está protegida por un sistema inmunológico adaptativo local, por lo que la mejora del crecimiento en broilers está relacionada con un mejor status de la morfología intestinal, ya que ésta está estrechamente relacionada con el fortalecimiento del sistema inmune, en el que tiene gran peso el adecuado balance microbiano del GIT. Se ha visto como las bacterias que tienen un papel probiótico tienen algunos efectos y propiedades inmunomoduladoras. Entre los posibles mecanismos de la terapia probiótica se encuentra la promoción de la barrera defensiva endógena del intestino (Isolauri y col., 2001), por medio de cambios significativos en la composición de la microbiota intestinal (Van der Hoeven-Hangoor y col., 2013; Tang y col., 2014b).

De acuerdo con Singh y col. (2012), una comunidad bacteriana próspera podría ser de ayuda en la correcta maduración del sistema inmune que por ende mejoraría la defensa contra patógenos intestinales. Schachtschneider y col. (2013) apuntan que la diversidad microbiana del GIT está involucrada también en el desarrollo y regulación de la respuesta inmune que tiene lugar fuera del GIT, y Yin y col. (2010) observaron que la composición de la microbiota intestinal está asociada con distintos perfiles de expresión genética inmunitaria en el íleon. Estudios relativamente recientes con mamíferos han demostrado que la microbiota bacteriana tiene un importante papel en el desarrollo de la inmunidad (Hrncir y col., 2008; Maslowski y Mackay, 2011) y afecta al balance energético y ganancia de peso del hospedador (Nicholson y col., 2012). Así mismo, se ha demostrado el efecto inmunomodulador de los antimicrobianos sobre la inmunidad, especialmente sobre la respuesta humoral (Brisbin y col., 2008), pero también sobre la inmunidad mediada por células en pollos broiler (Munir y col., 2007; Khalifeh y col., 2009). Arias y Koutsos (2006) indican que los antibióticos pueden influenciar la población de linfocitos en broilers, y que el efecto es diferente en un diferente ambiente

microbiano, indicando de esta forma interacciones complejas entre antibióticos, microbiota intestinal y desarrollo de inmunidad intestinal. Lee y Lillehoj (2011) opinan que el efecto de los antimicrobianos en la expresión de citoquinas difiere dependiendo del tipo de antimicrobianos, tejidos ensayados y edad de los pollos. Cualquier manipulación alimentaria para prevenir o tratar una situación de enfermedad en el pollo puede alterar la composición de la microbiota intestinal, lo que afectaría por ende a las respuestas protectoras del sistema inmune frente a los patógenos entéricos incluidos *Eimeria* spp, *Salmonella* spp y *Clostridium* spp.

4.4 Algunas implicaciones en nutrición aviar y perspectivas futuras

1. Estudio del sistema inmune de aves: una de las cuestiones más relevantes en este momento es el estudio de los mecanismos capaces de modular la funcionalidad del sistema inmune, ya que, como se ha indicado, se sabe que la nutrición, crianza y manejo de los animales influye en el desarrollo y funcionalidad de este sistema. El uso de diversos aditivos en la dieta [p.ej. hierbas en animales jóvenes (Pourhossein y col., 2015), probióticos potenciales como *Bacillus subtilis* (Lee y col. (2015), extracto de piel de naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Pourhossein y col., 2015), etc.] puede representar un procedimiento para estudiar la relación entre modificaciones en la composición de la microbiota y el desarrollo del sistema inmune. Se ha visto una clara interacción entre microorganismos, epitelio intestinal y células inmunológicas basada en la captación de señales microbianas a través de los patrones de sistemas receptores de reconocimiento del hospedador que interactúan con ellos e identifican patrones moleculares microbianos asociados a familias bacterianas tanto comensales como patógenas (Cisek y Binek, 2014).

2. Uso de las modernas técnicas de secuenciación masiva: la determinación de secuencias bacterianas permitiría desarrollar estrategias dietéticas para inducir cambios deseables en la composición de la microbiota digestiva (Corrigan y col., 2012). Recientemente el uso de las técnicas llamadas NGS (Next Generation Sequencing) de secuenciación masiva para estudiar la composición de la microbiota se ha extendido más allá del análisis filogenético para incluir también análisis funcionales (Torok y col., 2008; Stanley y col., 2012; Sergeant y col., 2014).

3. Evaluación de efectos sobre el bienestar animal: en un estudio realizado por Stanley y col. (2015) se pone en evidencia el gran interés que supone la identificación de la microbiota presente tanto en muestras fecales como cecales, mediante la secuenciación de los diferentes géneros y especies presentes, los cuales corresponden a funciones fisiológicas y productivas dentro de la fisiología aviar. El rendimiento tan sólo puede ser exitoso si se mantiene el ambiente saludable y una función óptima del intestino (Mountzouris y col., 2015). Un mejor conocimiento de la microbiota intestinal podría llevar a entender mejor las interacciones microbianas y la biodiversidad, lo cual es importante para implementar estrategias para mejorar tanto el estado sanitario como el bienestar animal.

4. Posibilidades para modular la composición de la microbiota intestinal: en aves probablemente el mejor momento sería en la fase de transición durante la cual la microbiota todavía es inestable. Se requiere aún bastante más investigación para evaluar el desarrollo y la

diversidad de la microbiota cecal e ileal conforme el pollo va adquiriendo edad. En producción comercial aviar, no existen proveedores microbianos naturales desde que los pollos son criados en los ambientes limpios de una explotación comercial. El uso de los productos de exclusión competitivos y probióticos podría proporcionar una colonización rápida y temprana de los pollos con bacterias sanas (Cisek y Binek, 2014).

5. Efecto anticoccidioso: algunos aditivos (aceites esenciales y plantas, DFM, probióticos, etc.) parecen actuar como promotores del crecimiento ejerciendo un efecto anticoccidioso frente a *Eimeria* spp, mejorando el rendimiento productivo y reduciendo la mortalidad y las lesiones intestinales (Barbour y col., 2015; Murugesan y col., 2014; Ritzi y col., 2014). En este sentido, el PTS-O podría ejercer un efecto similar a otros derivados del ajo que han demostrado su potencial frente a esta enfermedad (Kim y col. 2013; Wunderlich y col., 2014).

6. Efectos sobre la calidad de la carne: la adición de derivados del ajo en la dieta de broilers puede mejorar de manera significativa la calidad de la carne a nivel sensorial, químico y microbiológico (Kirkpinar y col., 2014; Zekic y col., 2014b; Singh y col., 2015). Choi y col. (2010) y Kim y col. (2009) prueban como estas sustancias tienen efectos sobre el perfil lipídico y la calidad organoléptica y sensorial de la carne.

7. Producción aviar en condiciones extremas: se ha comprobado que una alta densidad compromete la salud y el bienestar de los animales, al provocar estrés, bajo rendimiento productivo y gran contaminación por la multitud de desechos acumulados en las jaulas (Tsiouris y col., 2015). Estas condiciones podrían tener efectos perjudiciales en el crecimiento y desarrollo dando lugar a una mayor predisposición para sufrir enfermedades por microbiota patógena como la enteritis necrótica. Con respecto al estrés por alta temperatura se ha visto cómo puede influir en el metabolismo lipídico, el adecuado crecimiento y también en la adquisición o desarrollo de flora patógena (Akbarian y col., 2015). Dichos autores indican que la inclusión en la dieta de broilers de extractos naturales mejora su estatus metabólico.

Capítulo 5: Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el transcurso de esta Tesis Doctoral podemos concluir que:

- 1) La suplementación de raciones comerciales para pollos broiler con el derivado del ajo PTS-O a los niveles ensayados dio lugar a una reducción del número de bacterias patógenas y potencialmente patógenas en el contenido intestinal. Por tanto, este producto puede facilitar el control de las bacterias patógenas en producción aviar (particularmente *Salmonella* spp y *Campylobacter jejuni*). El efecto antimicrobiano del producto parece estar relacionado con la dosis suministrada.
- 2) La incorporación de este producto en la ración tuvo así mismo un efecto significativo sobre la composición de la microbiota intestinal habitual de las aves, afectando a grupos bacterianos relacionados con el crecimiento y la producción aviar como lactobacilos, bacteroides y enterobacterias. Estas modificaciones podrían estar relacionadas con un mejor rendimiento productivo.
- 3) A determinadas dosis, la incorporación de PTS-O modificó significativamente la estructura histológica de la mucosa ileal, concretamente la altura, la anchura y la superficie de absorción de las vellosidades intestinales, así como el grosor de la mucosa intestinal y de la capa muscular. Estas modificaciones pueden suponer un incremento en la capacidad de absorción intestinal de nutrientes.
- 4) La suplementación con PTS-O mejoró el rendimiento productivo de las aves, aumentando la ganancia de peso y disminuyendo el índice de transformación. La incorporación de este aditivo ha dado lugar también a incrementos en la digestibilidad de nutrientes y energía, así como de la fibra.
- 5) Estos resultados en conjunto sugieren una relación entre determinadas modificaciones de la composición de la microbiota intestinal y la productividad en broilers. En este sentido, se han determinado correlaciones positivas y negativas entre las proporciones de determinados grupos bacterianos de la microbiota digestiva y los parámetros productivos de las aves.
- 6) El derivado industrial del ajo PTS-O es estable y está bien caracterizado químicamente. Estos caracteres, junto a su efectividad demostrada en este trabajo, suponen una ventaja substancial frente otros productos derivados del ajo (ajo en polvo, ajo curado, ajo seco, extractos de ajo, etc.), y hacen que pueda representar una alternativa práctica fiable al uso de los AGP en producción aviar.

Capítulo 6: Resumen

El pollo doméstico constituye uno de los animales más importantes en la industria agraria y de producción alimentaria (Sergeant y col., 2014), y la microbiota bacteriana que habita su tracto gastrointestinal ejerce un función clave en la absorción y utilización de los nutrientes que estos animales ingieren en la ración (Bjerrum y col., 2006). Los cambios en la composición de la microbiota digestiva pueden dar lugar a problemas y desajustes en el rendimiento productivo y económico (Uni y col., 1999). Por tanto, poder controlar estos cambios es prioritario para que el estado sanitario, el bienestar y la productividad de estos animales sean los adecuados (Callaway y col., 2008; Ley y col., 2008). En particular, la flora patógena presente en este sistema puede dar lugar a infecciones subclínicas que conlleven una disminución en el rendimiento productivo y a contraer enfermedades (Tekeli y col., 2011).

Para desempeñar esta función se ha contado en la industria desde hace muchos años con los antibióticos promotores del crecimiento (AGP). Sin embargo, su prohibición por razones de seguridad ha disparado la búsqueda de posibles alternativas capaces de ejercer actividades similares y para paliar algunas infecciones bacterianas intestinales como salmonelosis y campylobacteriosis, cuya incidencia se incrementó tras la retirada de los AGP (Casewell y col., 2003). Entre las posibles alternativas se encuentran diversos derivados del ajo (Harris y col., 2001), que han demostrado su actividad frente a bacterias intestinales patógenas o potencialmente patógenas causantes de ciertos desórdenes gastrointestinales en animales (Amagase y col., 2001; Tatara y col., 2008). La bibliografía contempla numerosos estudios desarrollados en los últimos años que tienen como base la incorporación de productos derivados del ajo (Aji y col., 2011; Mansoub y col., 2011; Pourali y col., 2010) en dietas para aves, encontrándose con frecuencia efectos beneficiosos sobre la eficiencia alimentaria y el crecimiento de los pollos broiler (Khan y col., 2012). Sin embargo, los resultados aportados en la literatura son bastante variables en cuanto a la eficacia de estos productos en el rendimiento productivo y la modificación de parámetros fisiológicos y digestivos.

En consecuencia, debido al reciente interés en la industria aviar por reemplazar con éxito a los antibióticos, y dada la escasa información científica existente acerca del modo de acción de los derivados del ajo, dosis necesarias o duración del tratamiento, se han llevado a cabo una serie de ensayos *in vivo* con pollos broiler (estirpe Cobb) machos en crecimiento, con objeto de evaluar la idoneidad de un compuesto derivado del ajo bien definido y obtenido industrialmente (PTS-O, propil propano tiosulfonato) a diferentes concentraciones en la ración.

En la publicación 1 (Poultry Science 91: 2148-2157) se describen dos experimentos realizados con objetivo de estudiar los efectos de la incorporación de este producto a la ración sobre las poblaciones de enteropatógenos intestinales, morfología intestinal y rendimiento productivo en broilers. La ganancia de peso de los pollos alimentados con 45 mg/kg de PTS-O en la dieta fue mayor ($P < 0.01$) que en los controles. Los pollos alimentados con dietas que contenían entre 45 y 90 mg/kg de PTS-O tuvieron mejores índices de transformación que los controles. La altura de las vellosidades intestinales, su anchura y superficie, el grosor de la mucosa y de la capa muscular fueron mayores ($P < 0.01$) que los valores determinados en los controles. La inclusión de PTS-O en ambas concentraciones (45 y 90 mg/kg de dieta) dio lugar a un menor ($P < 0.01$) número de copias (q PCR) de *Salmonella* spp, enterobacterias y *E. coli* en diversas secciones intestinales. La inclusión de 90 mg de PTS-O /kg de dieta también resultó en menor ($P < 0.01$) número de copias de enterobacterias y *E. coli* en contenidos ileales y cecales,

respectivamente. Se determinó así mismo un menor ($P < 0.01$) número de copias de *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* en los contenidos ileales de broilers alimentados con dietas que contenían 135 mg de PTS-O/kg de dieta. Esta investigación confirma datos previos *in vitro* aportados por nuestro grupo de trabajo, y muestra que PTS-O es capaz de disminuir el número de enteropatógenos intestinales y mejorar la estructura histológica ileal y los parámetros productivos en broilers.

En la publicación 2 (*Animal Feed Science and Technology* 181: 87-92) el objetivo fue el estudio de los efectos de la suplementación de este mismo aditivo con dos niveles de suplementación en la dieta (45 y 90 mg de PTS-O por kg dieta), sobre la composición de la microbiota intestinal y la digestibilidad de nutrientes. El número de copias de *Lactobacillus* spp fue menor ($P < 0.05$) en los pollos alimentados con la dieta suplementada con PTS-O con respecto a los pollos que tomaron la dieta control en los contenidos del buche. En los contenidos ileales la alimentación con PTS-O-45 resultó en un menor ($P < 0.05$) número de copias de *Clostridium coccooides/Eubacterium rectale* y *Clostridium leptum*. Con la dosis de 90 mg/kg se observó un aumento ($P < 0.05$) en el número de bacteroides y bacterias totales en los contenidos ileales. Un menor ($P < 0.05$) número de copias de bacteroides fue determinado en los contenidos cecales de los pollos alimentados con PTS-O, mientras el número de copias de *C. coccooides/E. rectale* de los pollos alimentados con PTS-O fue también menor ($P < 0.05$) que en los controles. La digestibilidad fecal de energía, grasa y fibra (ADF y NDF) fue mayor que en los controles en los pollos alimentados con dietas suplementadas con PTS-O. La digestibilidad fecal de N y fibra fue mayor ($P < 0.05$) en los pollos que tomaron las dietas suplementadas. Esta investigación confirma los datos previos y muestra como el aditivo estudiado fue capaz de modular la composición de la microbiota intestinal y mejorar la digestibilidad de nutrientes en pollos broiler en crecimiento.

En la publicación 3 (*Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99: 418-423) el objetivo principal fue estudiar las posibles correlaciones entre los cambios que se producen en las proporciones de algunos de los principales grupos bacterianos de la microbiota intestinal y los parámetros productivos. Las proporciones relativas de bacteroides (bacteroides/bacterias totales) en los contenidos ileales correlacionaron ($P < 0.05$) positivamente con la digestibilidad fecal de celulosa, hemicelulosa y fibra (ADF y NDF). Las cantidades relativas de *Escherichia-Shigella* (*Escherichia-Shigella*/bacterias totales) en los contenidos del buche correlacionaron ($P = 0.05$) negativamente con la ganancia de peso de broilers. La digestibilidad fecal de N correlacionó ($P < 0.05$) negativamente con las bacterias totales en los contenidos ileales de pollos. Las cantidades relativas de *Escherichia-Shigella* (*Escherichia-Shigella*/bacterias totales) en los contenidos cecales se correlacionaron ($P = 0.05$) negativamente con la digestibilidad fecal de la grasa de broilers. Las bacterias totales en los contenidos ileales y cecales de pollos en crecimiento se correlacionaron ($P < 0.05$) negativamente con la digestibilidad ileal del N. Los resultados sugieren la existencia de relaciones entre los parámetros productivos y los cambios en la composición de la microbiota intestinal de pollos broiler en crecimiento.

De acuerdo con los resultados previamente descritos, consideramos que sería de gran interés el estudio del mecanismo de acción de PTS-O, aun no bien establecido, así como de las posibles relaciones entre los cambios en la composición de la microbiota y la eficiencia en la utilización de nutrientes y energía en broilers. Este objetivo podría abordarse utilizando como

herramientas determinados productos que, como PTS-O, tienen un efecto directo sobre la composición de la microbiota digestiva. Consideramos que los resultados de este trabajo aportan una información valiosa en este sentido, ya que los estudios orientados de manera específica al estudio de las variaciones entre la composición de la microbiota y los valores productivos/fisiológicos son todavía muy escasos en producción aviar.

Capítulo 7: Referencias Bibliográficas

- Abd El-Khalek, E., Kalmar, I.D., De Vroey, M., Ducatelle, R., Pasmans, F., Werquin, G. and Janssens, G.P.** 2012. Indirect evidence for microbiota reduction through dietary mannanoligosaccharides in the pigeon, an avian species without functional caeca. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berlin)* 96: 1084–1090.
- Abdelrahman, W., Mohnl, M., Teichmann, K., Doupovec, B., Schatzmayr, G., Lumpkins, B., Mathis, G.** 2014. Comparative evaluation of probiotic and salinomycin effects on performance and coccidiosis control in broiler chickens. *Poultry Science* 93(12): 3002-3008.
- Abudabos, A. M., Alyemni, A.H.** 2013. Effects of the essential oil blend CRINA (R) Poultry in feed on broiler performance and gut microbiology. *Italian Journal of Animal Science* 12(4)
- Abudabos, A. M., Al-Mufarrej, S. I.** 2014. Effects of organic acid supplementation on antioxidant capacity and immune responses of broilers challenged orally with *Salmonella enterica* subsp *enterica* Typhimurium. *South African Journal of Animal Science* 44(4).
- Ademola, S.G., G.O. Farinu y G.M. Babatunde.** 2009. Serum lipid, growth and hematological parameters of broilers fed garlic, ginger and their mixtures. *World Journal of Agricultural Sciences* 5: 99-104.
- Adesogan, A.T., Owen, E., Givens, D.I.** 1998. Prediction of the *in vivo* digestibility of whole crop wheat from *in vitro* digestibility, chemical composition, *in situ* rumen degradability, *in vitro* gas production and near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology* 74:259-272.
- Ahmed, S.T., Islam, M., Mun, H.S., Sim, H.J., Kim, Y.J., Yang, C.J.** 2014. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. *Poultry Science* 93(8):1963-71.
- Aho, P.,** 2012. Worldwide chicken, pork consumption forecast to continue increasing. *Watt Poultry USA* 13 (12): 12-13.
- Aidara-Kane, A.** 2012. Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective. *Revue Sceintifique Technique* 31: 277-287.
- Aji, S. B., K. Ignatius, A. Y. Ado, J. B. Nuhu, A. Abdulkarim, U. Aliyu, M. B. Gambo, M. A. Ibrahim, H. Abubakar, M. M. Bukar, H. M. Imam, y P. T. Numan.** 2011. Effect of feeding onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) on some performance characteristics of broiler chickens. *Research Journal of Poultry Sciences* 4:22-27.
- Akbarian, A., Golian, A., Kermanshahi, H. y col.** 2015. Antioxidant enzyme activities, plasma hormone levels and serum metabolites of finishing broiler chickens reared under high ambient temperature and fed lemon and orange peel extracts and *Curcuma xanthorrhiza* essential oil. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99(1): 150-162.
- 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.

- Ali, M., M. Thomson y M. Afzal.** 2000. Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 62: 55-73.
- Al-Kassie, G.A.M., A.M. Mohseen y R.A. Abd-Al-Jaleel.** 2011. Modification of productive performance and physiological aspects of broilers on the addition of a mixture of cumin and Turmeric to the diet. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences* 1: 31-34.
- Al-Sheikhly, F., and Al-Saieg, A.** 1980. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Diseases* 24:324-333.
- Allaart, J.G., Van Asten, A.J. A. M., Grone, A.** 2013. Predisposing factors and prevention of Clostridium perfringens-associated enteritis. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 36 (5): 449-464.
- Allen, H. K., Stanton, T.B.** 2014. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. *Annual Review of Microbiology* 68: 297-315.
- Almirall, M., Francesch, M., Perez-Vendrell, A.M., Brufau, J., Esteve- Garcia E.** 1995. The differences in intestinal viscosity produced by barley and beta-glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *The Journal of Nutrition* 125(4):947-55.
- Amad, A.A., Männer, K., Wendler, K.R., Neumann, K., Zentek, J.** 2011. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry Science* 90(12):2811-6.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y.** 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition* 131(3s):955S-62S.
- Amagase, H.,** 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of Nutrition* 136: 716S-725S.
- Amerah, A.M., Ravindran, V., Lentle, R.G. y Thomas, D.G.** 2007a. Feed particle size: implications on the digestion and performance of broilers. *World's Poultry Science Journal* 63: 439-455.
- Amerah, A.M., Ravindran, V., Lentle, R.G. y Thomas, D.G.** 2007b. Influence of particle size and feed form on the performance, energy utilization, digestive tract development, and digesta parameters of broiler starters. *Poultry Science* 86: 2651- 2623.
- Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z.** 2004. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poultry Science* 83:1093-1098
- An, B.K., J. Y. Kim, S. T. Oh, C. W. Kang, S. Cho, y S. K. Kim.** 2015. Effects of Onion Extracts on Growth Performance, Carcass Characteristics and Blood Profiles of White Mini Broilers. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 28 (2): 247-251.

- Anderson, D. B., V. J. McCracken, R. I. Aminov, J. M. Simpson, R. I. Mackie, M. W. A. Vestegen y H. R. Gaskins.** 1999. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information* 20:115N-122N.
- Anderson, R.C., Vodovnik, M., Min,B.R., Pinchak, W.E., Krueger,N.A., Harvey, R. B. y col.** 2012. Bactericidal effect of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Campylobacter jejuni* in vitro. *Folia Microbiologica* 57: 253–258.
- Ankri, S., Miron, T., Rabinkov, A., Wilechek, M., Mirelman, D.** 1997. Allicin from Garlic Strongly Inhibits Cystein Proteinases and Cytopathic Effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2286–2288.
- Ao, Z., Choct, M.** 2013. Oligosaccharides affect performance and gut development of broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* 26(1):116-21.
- Apajalahti, J.H., Kettunen, H., Kettunen, A., Holben, W.E., Nurminen, P.H., Rautonen, N., Mutanen, M.** 2002. Culture-independent microbial community analysis reveals that inulin in the diet primarily affects previously unknown bacteria in the mouse cecum. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10):4986-95.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., y H. Graham.** 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World Poultry Science Journal* 60: 223- 232.
- Apajalahti, J.** 2005. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. *The Journal of Applied Poultry Research* 14:444-453.
- Apajalahti, J., Kettunen, A.** 2006. Microbes of the chicken gastrointestinal tract. In: *Avian Gut Function in Health and Disease*. CAB International UK. 124-137
- Arias, V. J., Koutsos, E. A.** 2006. Effects of copper source and level on intestinal physiology and growth of broiler chickens. *Poultry Science* 85(6): 999-1007.
- Arora, S.D., Kaur, J.** 1999. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Antimicrobial Agents* 12:257–262
- Arsi, K., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., y Col.** 2014. The efficacy of the natural plant extracts, thymol and carvacrol against *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Journal of Food Safety* 34 (4): 321-325.
- Attia, Y. A., El-Tahawy, W. S., Abd El-Hamid, A. E., y col.** 2012. Effect of phytase with or without multienzyme supplementation on performance and nutrient digestibility of young broiler chicks fed mash or crumble diets. *Italian Journal of Animal Science* 11(3): 303-308
- Avato, P., Tursil, E., Vitali, C., Miccolis, V., Caddido, V.** 2000. Allyl sulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents. *Phytomedicine* 7: 239-243.

- Awad, W. A., Ghareeb, K., Boehm, J.** 2011. Evaluation of the chicory inulin efficacy on ameliorating the intestinal morphology and modulating the intestinal electrophysiological properties in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95(1): 65-72.
- Baer, D.J., Stote, K. S., Henderson, T. y col.** 2014. The Metabolizable Energy of Dietary Resistant Maltodextrin Is Variable and Alters Fecal Microbiota Composition in Adult Men. *Journal of Nutrition* 144(7): 1023-1029.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Di Gioia, D., Santini, C., Mogna, L., Biavati, B.A.** 2012. Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. *International Journal of Food Microbiology*. 157(2):156-61.
- Bakri, I.M., Douglas, C.W.I.** 2005. Inhibitory Effect of Garlic Extract on Oral Bacteria. *Archives of Oral Biology* 50: 645–651.
- Ball, M. E. E., Owens, B., McCracken, K. J.** 2013. Chemical and Physical Predictors of the Nutritive Value of Wheat in Broiler Diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26(1): 97-107
- Barbosa, B., Andre, N., Sakomura, N.K., Oviedo-Rondon, E.O. y col.** 2011. Mannan oligosaccharides in diets for broilers. *Ciencia Rural* 41(12): 2171-2176.
- Barbour, E. K., Bragg, R. R., Karrouf, G. y col.** 2015. Control of eight predominant *Eimeria* spp. involved in economic coccidiosis of broiler chicken by a chemically characterized essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 118 (3): 583-91.
- Barnes, E. M.** 1979. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *Journal of Applied Bacteriology* 46:407-19.
- Barnes, E. M., C. S. Impey y D. M. Cooper.** 1980. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. *American Journal of Clinical Nutrition* 33:2426-33.
- Barroeta, A.C., Izquierdo, D., Pérez, J.A.** 2011. *Manual de Avicultura, breve manual de aproximación a la empresa avícola para estudiantes de veterinaria*. Departament de Ciència Animal i dels Aliments Unitat de Ciència Animal. Facultat de Veterinària.
- Bashar, Y.A. y A. Abubakar.** 2008. Response of broiler starters fed diets with high level inclusion of wheat offal supplemented with garlic (*Allium sativum* L.). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences* 16: 12-16.
- Batal, A.B., Parsons, C.M.** 2002. Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. *Poultry Science* 81(3):400-7.
- Bauer, E., William, B.A., Voigt, C. y col.** 2001. Microbial activities of faeces from unweaned and adult pigs, in relation to selected fermentable carbohydrates. *Animal Science* 73:313- 322.
- Becker, P.M., Van Wikselaar, P.G., Mul, M.F., Pol, A., Engel, B., Wijdenes, J.W., Van der Peet-Schwering, C.M., Wisselink, H.J. and Stockhofe-Zurwieden, N.** 2012. *Actinobacillus pleuropneumoniae* is impaired by the garlic volatile allyl methyl sulfide (AMS) *in vitro* and in-feed garlic alleviates pleuropneumonia in a pig model. *Veterinary Microbiology* 154: 316–324

- Beckmann, L., Simon, O. y Vahjen, W.** 2006. Isolation and identification of mixed linked-glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities. *Journal of Basic Microbiology* 46:175–185.
- Bedford, M.R. y Summer, J.D.** 1985. Influence of the ratio of essential to non-essential amino acids on performance and carcass composition of the broiler chick. *British Poultry Science* 26: 483-491.
- Bedford, M.** 2000. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *World Poultry Science Journal* 56: 347-365.
- Begley, M., Hill, C. y Gahan, C. G.** 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied Environmental Microbiology* 72:1729–1738.
- Bélangier, S.D., Boissinot, M., Clairoux, N., Picard, F.J. y Bergeron, M.G.** 2003. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 730–734.
- Belenguer, A. y col.** 2006. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied Environmental Microbiology* 72: 3593–3599.
- Bingham, S.** 2006. The fibre – folate debate in colo-rectal cancer. *Proceedings of the Nutrition Society* 65(1): 19–23.
- Biorad.** 2006. *Real Time PCR Guide* [en línea]: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>
- Bjerrum, L., R. Engberg, M., Leser, T. D., Jensen, B. B., Finster, K. y Pedersen, K.** 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science* 85:1151–1164.
- Blair, R.** 2008. *Nutrition and Feeding of Organic Poultry*. Publisher: CABI; First edition. UK. 28-64.
- Blasco, L., Ferrer, S. y Pardo, I.** 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 225: 115-123.
- Block, E.** 2010. Garlic and Other Alliums. *The Lore and The Science*; RSC publishing: Cambridge, UK.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C.H., Nwachukwu, I.D. y Slusarenko, A.J.** 2014. Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules* 19: 12591-12618
- Botsoglou, E., Govaris, A., Christaki, E., Botsoglou, N.** 2010. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry* 121: 17-22.
- Bozkurt, M., K. Kucukyilmaz, A.U. Catli y M. Cinar.** 2009. Effect of dietary mannan-oligosaccharide with or without oregano essential oil and hop extract supplementation on the

performance and slaughter characteristics of male broilers. *South African Journal of Animal Science* 39: 223-232.

Bozkurt, M., Kucukyilmaz, K., Catli, A. U. y col. 2012. Influences of an essential oil mixture supplementation to corn versus wheat-based practical diets on growth, organ size, intestinal morphology and immune response of male and female broilers. *Italian Journal of Animal Science* 11(3): 290-297.

Bozkurt, M., Aysul, N., Kucukyilmaz, K. y col. 2014. Efficacy of in-feed preparations of an anticoccidial, multienzyme, prebiotic, probiotic, and herbal essential oil mixture in healthy and *Eimeria spp.*-infected broilers. *Poultry Science* 93 (2): 389-399.

Brautigan, I.M. 1991. *Nutrición Animal*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José. Costa Rica.

Brennan, J., J. Skinner, D.A. Barnum y J. Wilson, 2003. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry Science* 82: 360-363

Brewster, J.L. 2008. *Onions and Other Vegetable Alliums*; CABI Publishing: Wallingford, UK.

Brisbin, J.T., Gong, J., Lusty, C.A., Sabour, P., Sanei, B., Han, Y., Shewen, P.E., Sharif, S. 2008. Influence of in-feed virginiamycin on the systemic and mucosal antibody response of chickens. *Poultry Science* 87:1995-1999.

Brown, W. R., S. J. Hubbard, C. Tickle y S. A. Wilson. 2003. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature Reviews Genetics* 4:87–98.

Burrin, D., Stoll, B., Moore, D. 2013. Digestive physiology of the pig symposium: intestinal bile acid sensing is linked to key endocrine and metabolic signaling pathways. *Journal of Animal Science* 91:1991–2000.

Burrows, C.F., Kronfeld, D.S., Banta, C.A. y col. 1982. Effects of fiber on digestibility and transit time in dogs. *The Journal of Nutrition* 112 (9): 1726-1732.

Burt, D.W. 2007. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry Science* 86: 1460–1471.

Calabro, S., Carone, F., Cutrignelli, M.I. y col. 2006. The effect of haymaking on the neutral detergent soluble fraction of two intercropped forages cut at different growth stages. *Italian Journal of Animal Sciences* 5: 327-339.

Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A. y Nisbet, D. J. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to Salmonella. *Journal of Animal Science* 86: E163–E172.

Carciofi, A.C., Vasconcellos, R.S., De-Oliveira, L.D. y col. 2007. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs - A comparison of methods of analysis. *Animal Feed Science and Technology* 134: 273-282.

- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I.** 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 159-161.
- Castiglioni, A.** 1978. *A History of Medicine*; Jason Aronson Inc.: New York, NY, USA.
- Castelló, J.A., Cedo Benet, R., Cepero Briz, R., García Martín, E., Pontes Pontes, M., Vaquerizo Florez, J.M^a.** 2002. *Producción de carne de pollo* (2^a Edición.). Real Escuela de Avicultura, Barcelona, España.
- Castrillo, C., Hervera, M., Baucells, M.D.** 2009. Methods for predicting the energy value of pet foods. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38 (1): 1-14.
- Castro, F.O., Portelles, Y.** 1997. Transfección de ADN a células de mamíferos. *Bioteología aplicada* 14: 149-161.
- Cavalari, A.P, Lopes, D.J., Viana, J.A. y col.** 2006. Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e proteicos utilizados em rações para cães adultos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35 (5). 1985-1991.
- Cavallito, C., Bailey, J.** 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society* 66: 1950–1951.
- Cavallito, C., Bailey, J., Buck, J.** 1945. The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and “essential oil of garlic”. *Journal of the American Chemical Society* 67: 1032–1033.
- CDC, Centers for Disease Control.** 2000. Campylobacter infections: General information and technical information. *Division of Bacterial and Mycotic Diseases*.
- CDC, Centers for Disease Control.** 2001. Foodborne infections: General information and technical information. *Division of Bacterial and Mycotic Diseases*.
- CDC, Centers for Disease Control.** 2011. Foodborne infections: General information and technical information. *Division of Bacterial and Mycotic Diseases*.
- Cellini, L., E. Di Campli, M. Masulli, S. Di Bartolomeo, y N. Allocati.** 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 13:273–277.
- Chae, B. J., Ingale, S. L., Kim, J. S. y col.** 2012. Effect of Dietary Supplementation of Probiotics on Performance, Caecal Microbiology and Small Intestinal Morphology of Broiler Chickens. *Animal Nutrition and Feed Technology* 12 (1): 1-12.
- Chan, J. M., Wang, F., y Holly, E. A.** 2005. Vegetable and fruit intake and pancreatic cancer in a population-based case-control study in the San Francisco bay area. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 14(9): 2093-2097.

- Chang, K. y S. Cheong.** 2008. Volatile organosulfur and nutrient compound from garlic by cultivating areas and processing methods. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 22:1108-1112
- Chen, W., Wang, J.P., Yan, L., Huang, Y.Q.** 2013. Evaluation of probiotics in diets with different nutrient densities on growth performance, blood characteristics, relative organ weight and breast meat characteristics in broilers. *British Poultry Science* 54(5):635-41.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S. y col.** 2014. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology* 5:217
- Chivers, D. J. y C. M. Hladik.** 1980. Morphology of the gastrointestinal tract in primates: comparisons with other mammals in relation to diet. *Journal of Morphology* 166:337-86.
- Cho, J. H., Song, M. H., Kim, I.H.** 2014. Effect of microencapsulated blends of organic acids and essential oils supplementation on growth performance and nutrient digestibility in finishing pigs. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 27(4): 264-272.
- Choct, M. y Annison G.** 1992. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: Roles of viscosity and gut microflora. *British Poultry Science* 33:821–834.
- Choct, M., Hughes, R.J., Wang, J., Bedford, M.R., Morgan, A.J. y Annison, G.** 1996. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science.* 37:609–621.
- Choi, I. H., Park, W. Y., Kim, Y. J.** 2010. Effects of dietary garlic powder and alpha-tocopherol supplementation on performance, serum cholesterol levels, and meat quality of chicken. *Poultry Science* 89(8): 1724-1731.
- Choi, S.C., Ingale, S.L., Kim, J.S., Park, Y.K., Kwon, I.K., Chae, B.J.** 2013. An antimicrobial peptide-A3: effects on growth performance, nutrient retention, intestinal and faecal microflora and intestinal morphology of broilers. *British Poultry Science* 54(6):738-46.
- Choi, J.H., Kim, G.B., Cha, C.J.** 2014. Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science* 93(8):1942-50.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., Giannenas, I., Papazahariadou, M., Botsoglou, N.A., Spais, A.B.** 2004. Effect of a mixture of herbal extracts on broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Animal Research* 53: 137-144.
- Cisek, A. A., Binek, M.** 2014. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 17(2): 385-394
- Clemente, A., Jiménez, E., Marín-Manzano, M.C., Rubio, L. A.** 2008. Functional Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 513-521
- Clench, M. H. y J. R. Mathias.** 1995. The Avian Cecum: A Review. *Wilson Bulletin* 107: 93- 121.

- Clench, M.H.** 1999. The Avian Cecum: Update and Motility Review. *Journal of Experimental Zoology* 283:441-447.
- Close, W. H.** 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in Pork Production* 11:47–56
- Cobb-vantress.com.** 2012. *Suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición de pollos de engorde Cobb500.*
- Cockburn, D. W., Orlovsky, N.I., Foley, M. H. y col.** 2015. Molecular details of a starch utilization pathway in the human gut symbiont *Eubacterium rectale*. *Molecular Microbiology* 95(2): 209-230.
- Cole, J. R. y Chai. B.** 2003. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* 31:442-443
- Coles, L.T., Moughan, P.J., Awati, A. y col.** 2011. Influence of assay conditions on the in vitro hindgut digestibility of dry matter. *Food chemistry* 125 (4): 1351-1358.
- Collado, M.C. y Y. Sanz.** 2007. Characterization of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota of pigs and chickens using culture-based and molecular methodologies. *Journal of Food Protection* 70:2799-2804.
- Collier, C. T., M. R. Smiricky-Tjardes, D. M. Albin, J. E. Wubben, V. M. Gabert, B. Deplancke, D. Bane, D. B. Anderson, y H. R. Gaskins.** 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *Journal of Animal Science* 81:3035–3045.
- Collier, C. T., Hofacre, C. I., Payne, A. M., Anderson, D. B., Kaiser, P., Mackie, R. I., and Gaskins, H. R.** 2008. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic 30 enteritis by supporting clostridium perfringens growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122:104-115.
- Corchero, J., Brumano, G., Serrano, M.P. Valencia, D.G., Frikha, M. y Mateos, G.G.** 2008. Influence of soybean meal source and feed form of the diet on performance organ size, and gizzard pH of broilers from 0 to 25 days of age. *Poultry Science* 87 (supplement 1, abstract)
- Corrigan, A., Horgan, K., Clipson, N. y col.** 2012. Effect of Dietary Prebiotic (Mannan Oligosaccharide) Supplementation on the Caecal Bacterial Community Structure of Turkeys. *Microbial Ecology* 64(3): 826-836
- Corzo-Martínez, M., N. Corzo y M. Villamiel.** 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology* 18: 609-625.
- Cowieson, A. J. y Ravindran, V.** 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: Growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *British Poultry Science* 49:37-44.
- Craven, S. E.** 2000. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poultry Science* 79:843-9.

- Crhanova, M., Hradecka, H., Faldynova, M., Matulova, M., Havlickova, H., Sisak, F., Rychlik, I.** 2011. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. *Infection and Immunity* 79:2755–2763.
- Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K., Acamovic, T.** 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science* 48(4):496–506.
- Cross, D. E., McDevitt, R. M., Acamovic, T.** 2011. Herbs, thyme essential oil and condensed tannin extracts as dietary supplements for broilers, and their effects on performance, digestibility, volatile fatty acids and organoleptic properties. *British Poultry Science* 52 (2): 227-237.
- Cullen, S.P., Monahan, F.J., Callan, J.J., O'Doherty, J.V.** 2005. The effect of dietary garlic and rosemary on grower-finisher pig performance and sensory characteristics of pork. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 44(1): 57-67.
- Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., Slusarenko, A.J.** 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 79–89.
- Cutler, R.R., Wilson, P.** 2004. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science* 61: 71–74.
- Dahiya, J.P., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G. y Drew, M.D.** 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post- antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology* 129: 60–88.
- De Barros, V.R.S.M., Lana, G.R.Q., Lana, S.R.V., Lana, A.M.Q., Cunha, F.S., Fabio, S., Neto, J.V.** 2015. Beta-mannanase and mannan oligosaccharides in broiler chicken feed. *Ciencia Rural* 45 (1): 111-117.
- De Brito, C.B.M., Félix, A.P., De Jesús, R.M. y col.** 2010. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. *Animal Feed Science and Technology* 159 (3): 150-155.
- Dekich, M.** 1998. Broiler industry strategies for control of respiratory and enteric diseases. *Poultry Science* 77:1176-1180.
- Delaha, E.C. y Garagusi, V.F.** 1985. Inhibition of mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27:485–486
- De Lancey Pulcini, E.** 2001. Bacterial biofilms: A review of current research. *Nephrologie* 22:439–441.
- Demir, E., S. Sarica, M. A. Ozcan, y M. Suicmez.** 2003. The use of natural feed additives as alternatives for an antibiotic growth promoter in broiler diet. *British Poultry Science* 44:44-45.

- De Vries, J.J.C., Arents, N.L.A., Manson, W.L.** 2008. *Campylobacter* species isolated from extra-oro-intestinal abscesses: a report of four cases and literature review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 27: 1119-1123.
- Dhama, K., Tiwari, R., Khan, R.U., Chakraborty, S., Gopi, M., Karthik, K. y col.** 2014. Growth Promoters and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles and Beneficial Applications: The Trends and Advances-A Review. *International Journal of Pharmacology* 10(3): 129-159
- Diarra, M.S. y Malouin, F.** 2014. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in Microbiology* 5:282
- Dibner, J. J. y J. D. Richards.** 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84: 634-643.
- Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F. y col.** 2015. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal* 9(1): 43-48
- Duke, G. E.** 1997. Gastrointestinal physiology and nutrition in wild birds. *Proceedings of the Nutrition Society* 56:1049-56.
- Dupont, A., Heinbockel, L., Brandenburg, K. y col.** 2014. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes* 5(6): 761-5
- Durak, I., Kavutcu, M., Aytac, B., Avci, A., Devrim, E. y Ozturk, H.** 2004. Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15(6): 373-377
- Eits, R.M., Kwakkel, R.P., Verstegen, M.W.A., Emmans, G.C.** 2003. Responses of broiler chickens to dietary protein: Effects of early life protein nutrition on later responses. *British Poultry Science* 44: 398-409.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B.** 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Natures Reviews Microbiology* 11: 497-504.
- Erayeh, A. S., Yildiz, G.** 2012. Effects of inulin and beta-glucan supplementation in broiler diets on growth performance, serum cholesterol, intestinal length, and immune system. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 36 (4): 388-394.
- Elson, C.O. y Cong, Y.** 2012. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 3: 332–344.
- Elwinger, K., E. Berndtson., B. Engström., O. Fossum., y L. Waldenstedt.** 1998. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinava* 39:433–441.
- Emmans, G.C.** 1981. A model of the growth and feed intake of ad libitum fed animals, particularly poultry. In: *Computers in Animal Production*. pp. 103-110. Occ: Publications. 5. British Society of Animal Production.

- Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Leser, T.D., Jensen, B.B.** 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science* 79:1311–19.
- Englyst, H.N., Quigley, M.E., Hudson, G.J., Cummings, J.H.** 1982. Determination of dietary fiber as non-starch polysaccharides by gas–liquid chromatography. *Analyst* 117:1707–1714.
- Ensminger, M.E., Oldfield, J.E. y Heinemann, W.W.** 1990. *Feeds & nutrition*. Clovis, California, EE.UU., Ensminger Publishing.
- Epps, S.V., Harvey, R.B., Byrd, J.A., Petrujkić, B.T., Sedej, I., Beier, R.C., Phillips, T.D., Hume, M.E., Anderson, R.C., Nisbet, D.J.** 2015. Comparative effect of thymol or its glucose conjugate, thymol- β -D-glucopyranoside, on *Campylobacter* in avian gut contents. *Journal of Environmental Science and Health Part. B, Pesticides, food contaminants and agricultural wastes* 50(1):55-61.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. y Coppola, S.** 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 610-617.
- European Commission (EC).** 2001. *Guidelines for the assessment of additives in feedingstuffs: Additives other than micro-organisms and enzymes*.
- European Commission (EC).** 2013. *Poultry Meat. Agriculture and rural development*.
- European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC),** 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal* 11(4):3129, 250 pp.
- European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC),** 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013; *EFSA Journal* 11(4):3129, 250 pp.
- Eyng, C., Murakami, A. E., Santos, T. C. y col.** 2015. Immune Responses in Broiler Chicks Fed Propolis Extraction Residue-supplemented Diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28(1): 135-142.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. OMS, Organización Mundial de la Salud.** 2009. *Codex Alimentarius*.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 2010. *Poultry Meat and Eggs. Agribusiness handbook*.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. OMS, Organización Mundial de la Salud.** 2013. *Codex Alimentarius*.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 2013a. *Desarrollo Avícola*.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 2013b. *Perspectivas Alimentarias. Resúmenes de Mercado*.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. *Perspectivas Alimentarias. Resúmenes de Mercado.*

FEEDAP, The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed of EFSA, European Food Safety Authority, 2013.

Feldberg, R. y Chang, S. 1988. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32: 1763–1768.

Feng, Y., Joshua, G., Yu, H., Jin, Y., Zhu, J., Han, Y. 2010. Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology* 140(1–2):116–21.

Fernandes, S.A., Ghilardi, A.C.R., Tavechio, T.A., Machado, A.M.O., Pignatari, A.C.C., 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella enteritidis* strains isolated in Sao Paulo, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo Brazil* 45 (2): 59–63

Flekna, G., P. Stefanic, M. Wagner, F.J.M. Smulders, S.S. Mozina, I. Hein. 2007. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology* 158: 405–412

Florou-Paneri, P., Giannenas, I., Christaki, E., Govaris, A., Botsoglou, N. 2006. Performance of chickens and oxidative stability of the produced meat as affected by feed supplementation with oregano, vitamin C, vitamin E and their combinations. *Archiv fur Geflugelkunde* 70: 232-240.

FDA, Food and Drug Administration. 2012. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.* Second Edition.

Focke, M., Feld, A., Lichtenthaler, H.K. 1990. Allicin, A Naturally Occurring Antibiotic from Garlic, Specifically Inhibits Acetyl-CoA Synthetase. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 261 (1): 106–108.

Forder, R. E. A., G. S. Howarth, D. R. Tivey, y R. J. Hughes. 2007. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poultry Science* 86:2396–2403.

Forgetta V., H. Rempel, F. Malouin , R. Jr. Vaillancourt, E. Topp, K. Dewar y M. S. Diarra. 2012. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. *Poultry Science* 91:512–525.

Fortes, C.M.L.S, Carciofi, A.C., Sakomura, N.K. y col. 2010. Digestibility and metabolizable energy of some carbohydrate sources for dogs. *Animal Feed Science and Technology* 156 (3):121-125.

Frankic, T., M. Voljc, J. Salobir y V. Rezar. 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae. Slovenica* 94:95-102.

- Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T., Ariga, T.** 2009. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 1948–1955.
- Fujita, H., Eishi, Y., Ishige, I., Saitoh, K., Takizawa, T., Arima, T. Koike, M.** 2002. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria spp.*, *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology* 37: 509–516.
- Fuller, R., y B. E. Brooker.** 1974. *Lactobacilli* which attach to the crop epithelium of the fowl. *American Journal of Clinical Nutrition* 27:1305-12.
- Gaskins, H. R., C. T. Collier y D. B. Anderson.** 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal Biotechnology* 13:29-42.
- Geier, M.S., Torok, V.A., Allison, G.E., Ophel-Keller, K. y Hughes, R.J.** 2009. Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but do not influence the performance of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1540-1548.
- George, B.A., C.L. Quarles y D.J. Fagerberg.** 1982. Virginiamycin effects on controlling necrotic enteritis infection in chickens. *Poultry Science* 61: 447-450.
- Ghosh, S., Mehla, R.K., Sirohi, S.K., Roy, B.** 2010. The effect of dietary garlic supplementation on body weight gain, feed intake, feed conversion efficiency, faecal score, faecal coliform count and feeding cost in crossbred dairy calves. *Tropical Animal Health and Production* 42(5): 961-968
- Ghosh, S., Mehla, R.K., Sirohi, S.K., Tomar, S.K.** 2011. Performance of crossbred calves with dietary supplementation of garlic extract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95(4): 449-455.
- Ghosh, T.K., Haldar, S., Bedford, M.R., Muthusami, N., Samanta, I.** 2012. Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berlin)* 96(2):275-84.
- Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Botsoglou, N.A., Christaki, E., Spais, A.B.** 2005. Effect of supplementing feed with oregano and or α -tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat. *Journal of Animal Feed Science* 14: 521-535
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125: 1401–1412
- Goh, S. G., C. H. Kuan, Y. Y. Loo, W. S. Chang, Y. L. Lye, P. Soopna, J. Y. H. Tang, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, L. Afsah-Hejri, y R. Son.** 2012. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poultry Science* 91:2686–2690.

- Gomide, M. H. J., Sterzo, E. V., Macari, M., y Boleli, I. C.** 2004. Use of scanning electron microscopy for the evaluation of intestinal epithelium integrity. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33:1500-1505.
- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., Sabour, P. M., And Chen, S.** 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology* 41:171-179.
- Gong, J., H. Yu, T. Liu, J. J. Gill, J. R. Chambers, R. Wheatcroft, y P. M. Sabour.** 2008. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology* 104:1372–1382.
- Goodarzi Borojani, F., Mader, A., Knorr, F., Ruhnke, I., Röhe, I., Hafeez, A., Männer, K., and Zentek, J.** 2014a. The effects of different thermal treatments and organic acid levels on nutrient digestibility in broilers. *Poultry Science* 93: 1159–1171
- Goodarzi Borojani, F., W. Vahjen, A. Mader, F. Knorr, I. Ruhnke, I. Röhe, A. Hafeez, C. Villodre, K. Männer, y J. Zentek.** 2014b. The effects of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science* 93: 1440–1452.
- Goodarzi, M., Nanekarani, S.** 2014. Effect of Onion Extract in Drink Water on Performance and Carcass Traits in Broiler Chickens. *IERI Procedia* 8: 107 – 112
- Goodarzi, M., Nanekarani, S., Landy, N.** 2014. Effect of dietary supplementation with onion (*Allium cepa L.*) on performance, carcass traits and intestinal microflora composition in broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (1): S297-S301.
- Gorinstein, S., J. Drzewiecki, H. Leontowicz, M. Leontowicz, K. Najman, Z. Jastrzebski, Z. Zachwieja, H. Barton, B. Shtabsky, E. Katrich y S. Trakhtenberg.** 2005. Comparison of the bioactive compounds and antioxidant potentials of fresh and cooked Polish, Ukrainian and Israeli garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2726-2732.
- Gous, R.M., G.C. Emmans, L.A. Broadbent, C. Fisher.** 1990. Nutritional effects on the growth and fatness of broilers. *British Poultry Science* 31:495–505
- Gous, R.M.** 2010. Nutritional limitations on growth and development in poultry. *Livestock Science* 130: 25-32.
- Gous, R.M., G.C. Emmans y C. Fisher.** 2012. The performance of broilers on a feed depends on the feed protein content given previously. *South African Journal of Animal Science* 42(1):63-73.
- Graham, H. y P. Aman.** 1991. Nutritional aspects of dietary fibers. *Animal Feed Science and Technology* 32:143–158
- Grand, R. J., J. B. Watkins y F. M. Torti.** 1976. Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology* 70:790-810.
- Grist, A.** 2006. *Poultry Inspection: Anatomy, physiology and disease conditions*, p. 276, Second ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

- Groeneveld, L.F., Lenstra, J.A., Eding, H. y col y The GLOBALDIV Consortium.** 2010. Genetic diversity in farm animals – a review. *Animal Genetic* 41: 6–31.
- Gröner, T., Pfeffer, E.** 1977. Digestibility of organic matter and digestible energy in single ingredients of extruded dog feeds and their effects on faecal dry matter concentration and consistency. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77 (1.5): 214-220, 1977.
- Guardia, S., Konsak, B., Combes, S., Levenez, F., Cauquil, L., Guillot, J.F., Moreau-Vauzelle, C., Lessire, M., Juin, H., Gabriel, I.** 2011. Effects of stocking density on the growth performance and digestive microbiota of broiler chickens. *Poultry Science* 90(9):1878-89.
- Guo, S., Liu, D., Zhao, X., y col.** 2014. Xylanase supplementation of a wheat-based diet improved nutrient digestion and mRNA expression of intestinal nutrient transporters in broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Poultry Science* 93 (1): 94-103.
- Hafez, H.M.** 2011. Enteric diseases of poultry with special attention to *Clostridium perfringens*. *Pakistan Veterinary Journal* 31: 175-184.
- Han, W., Zhang, X.L., Wang, D.W., Li, L.Y., Liu, G.L., Li, A.K., Zhao, Y.X.** 2013. Effects of microencapsulated *Enterococcus faecalis* CG1.0007 on growth performance, antioxidation activity, and intestinal microbiota in broiler chickens. *Journal of Animal Science* 91(9):4374-82.
- Hardy, B.** 2002. The issue of antibiotic use in the livestock industry: what have we learned? *Animal Biotechnology* 13:129–147
- Harmon, D.** 2007. Experimental approaches to study the nutritional value of foods ingredients for dogs and cats. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36: 251-262, 2007.
- Harris, N. V., N. S. Weiss y C. M. Nolan.** 1986. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *Animal Public Health* 6:407–411.
- Harris, J. C., S. L. Cottrell, S. Plummer y D. Lloyd.** 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology Biotechnology* 57:282–286
- Harvey, W.** 1628. *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*. Guiliemi Fitzeri, Frankfurt, Germany.
- Hashemi, S.R., Zulkifli, I., Hair, Bejo, M., Farida, A., Somchit, M.N.** 2008. Acute toxicity study and phytochemical screening of selected herbal aqueous extract in broiler chickens. *International Journal of Pharmacology* 4:352 –360.
- Hashemi, S.R., Davoodi, H.** 2010. Phytochemicals as new class of feed additive in poultry industry. *Journal of Animal Veterinary Advances* 9:2955 – 2304
- Havenstein, G.B., Ferket, P.R., Grimes, J.L., Qureshi, M.A., Nestor, K.E.** 2007. Comparison of the performance of 1966- versus 2003-type turkeys when fed representative 1966 and 2003 turkey diets: growth rate, livability, and feed conversion. *Poultry Science* 86(2):232-40.
- He, Q., Wang, J.-P., Osato, M. y Lachman, L.B.** 2002. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 3720–3728.

- Hermans, D., F. Pasmans, W. Messens, A. Martel, F. Van Immerseel, G. Rasschaert, M. Heyndrickx, K. Van Deun, y F. Haesebrouck.** 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector- Borne and Zoonotic Diseases* 12:89–98.
- Hernández, F., Madrid. J., García, V., Orengo, J., Megías, M.D.** 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science* 83(2):169-74.
- Hernández-Hernández, O., Marín-Manzano, M.C., Rubio, L.A., Moreno, F.J., Sanz, M.L. and Clemente, A.** 2012. The structure and composition of galacto-oligosaccharides affects their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *Journal of Nutrition* 142: 1232-1239.
- Hervera, M., Baucells, M.D., Blanch, F. y col.** 2007. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91 (5-6): 205-209.
- Hill, F.W. y Anderson, D.L.** 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *Journal of Nutrition* 64: 587-603.
- Hill, R.W., Wyse, G.A.** 2006. *Animal Physiology*. Editorial Médica Panamericana.
- Honjo, K., T. Hagiwara, K. Itoh, E. Takahishi y Y. Hirota.** 1993. Immunohistochemical analysis of tissue distribution of B and T cells in germfree and conventional chickens. *Journal of Veterinary Medical Science* 55:1031–1034.
- Hooper, L. V.** 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology* 12:129-34.
- Hossain, M.M., Lee, S.I., Kim, I.H.** 2014. Effect of dietary Korean aged garlic extract by *Leukonostoc citreum* SK2556 on production, hematological status, meat quality, relative organ weight, targeted *Escherichia coli* colon y and excreta gas emission in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 198: 333–340.
- Hrcir, T., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Tlaska -lova-Hogenova, H.** 2008. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: Studies in germ-free mice. *BMC Immunology* 9:65.
- Hugenholtz, P. y N. R. Pace.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology* 14:190-7.
- Humphrey, B.D., Klasing, K.C.** 2003. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. In: *Proceedings of the European Symposium on Poultry Nutrition*, Lillehammer, Norway.
- Humphrey, S., Chaloner, G., Kemmett, K. y col.** 2014. *Campylobacter jejuni* Is Not Merely a Commensal in Commercial Broiler Chickens and Affects Bird Welfare. *MBIO* 5(4).
- Hunton, P.** 2006. 100 years of poultry genetics. *World's Poultry Science Journal* 62:417–428.

- Hussain, S.P., Jannu, L.N., Rao, A.R.** 1990. Chemopreventive Action of Garlic on Methylcholanthrene- Induced Carcinogenesis in the Uterine Cervix of Mice. *Cancer Letter* 49: 175–180.
- Huys, G., Vanhoutte, T., Vandamme, P.** 2008. Application of sequence-dependent electrophoresis fingerprinting in exploring biodiversity and population dynamics of human intestinal microbiota: what can be revealed? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. doi: 10.1155/2008/597603.
- Irfan-Maqsood, M.** 2015. 1st Symposium on Y-Chromosome Human Proteome Project. *Cell Journal* 16 (4): 564-567.
- Isolauri, E., Y. Sütas, P. Kankaanpää, H. Arvilommi y S. Salminen.** 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:444S-450S.
- Ivarsson, E., Roos, S., Liu, H. Y. y col.** 2014. Fermentable non-starch polysaccharides increases the abundance of Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas in ileal microbial community of growing pigs. *ANIMAL* 8(11): 1777-1787.
- Jacob, C.** 2014. Special Issue: Redox Active Natural Products and Their Interaction with Cellular Signalling Pathways. *Molecules* 19 (12): 19588-19593.
- Javandel, F., B. Navidshad, J. Seifdavati, G.H. Pourrahimi y S. Baniyaghoub.** 2008. The Favourite Dosage of Garlic Meal as a Feed Additive in Broiler Chickens Ratios. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(13): 1746-1749.
- Jensen, B. B.** 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal Feed Science* 7:45–64
- Jiménez-Moreno, E., González-Alvarado, J. M., González-Serrano, A., Lázaro, R. y Mateos, G. G.** 2009. Effect of dietary fiber and fat on performance and digestive traits of broilers from one to twenty-one days of age. *Poultry Science* 88:2562–2574
- Jimoh, A.A., Ibitoye, E.B., Dabai, Y.U. y S. Garba.** 2014. In vivo Antimicrobial Potentials of Garlic against Clostridium perfringens and Its Promotant Effects on Performance of Broiler Chickens. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(24):1978-84.
- Jo, J. K., S. Y. Yoon, J. S. Kim, Y. W. Kim, K. Yun, I. K. Kwon, y B. J. Chae.** 2009. Effect of garlic extract supplementation on growth performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and meat composition in broilers. *Korean Journal of Poultry Science* 36:287-292.
- Johansen, C.H., Bjerrum, L., Pedersen, K.** 2007. Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica*: 49:30.
- Josling, P.** 2007. *Allicin—The Heart of Garlic*; NWI Publishing: Callahan Florida, FL, USA.
- Józefiak, D., A. Rutkowski, S.A. Martin.** 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Animal Feed Science and Technology* 113: 1–15.

Jull, M. A. 1953. *Avicultura*. 2^o Edition. Unión tipográfica Editorial Hispano Americana. México D.F.

Julliand, V., De Fombelle, A., Varloud, M. 2006. Starch digestion in horses: The impact of feed processing. *Livestock Science* 100: 44-52.

Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., Chaabounia, S.E. 2014. Garlic (*Allium sativum L.*) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and products* 62: 34-41.

Kalmendal, R., Tauson, R. 2012. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal morphology in broiler chickens fed a wheat-soybean meal-based diet. *Poultry Science* 91(6): 1387-1393.

Kamada, N., Kim, Y.G., Sham, H.P., Vallance, B.A., Puente, J.L., Martens, E.C., Nunez, G. 2012. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 336: 1325-1329.

Kamel, C. 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. Pages 135–150 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Kanginakudru, S., Metta, M., Jakati, R.D., Nagaraju, J. 2008. Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC Evolutionary Biology* 10(8):174.

Kasapidou, E., I. Giannenas, P. Mitlianga, E. Sinapis, E. Bouloumpasi, K. Petrotos, A. Manourasa y I. Kyriazakis. 2014. Effect of *Melissa officinalis* supplementation on growth performance and meat quality characteristics in organically produced broilers. *British Poultry Science* 55 (6): 774-784.

Kavanagh, S., Lynch, P.B., O'Mara, F. y col. 2001. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 89: 49- 58.

Keener, K. M., M. P. Bashor, P. A. Curtis, B. W. Sheldon, y S. Kathariou. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:105–115.

Keklik, N. M., A. Demirci, y V. M. Puri. 2010. Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light. *Poultry Science* 89:570–581.

Kellems, R.O. y Church, D.C. 2010. *Livestock feeds and feeding*. Boston, Massachusetts, EE.UU., Prentice Hall.

Kelly D., Conway S. 2001. Genomics at work: the global response to enteric bacteria. *Gut* 49: 612-613.

- Kemp, C., C. Fisher, M. Kenny.** 2005. Genotype — nutrition interactions in broilers; response to balanced protein in two commercial strains. *15th European Symposium on Poultry Nutrition*, Balatonfüred, Hungary. 54–56
- Kennedy, S., Oswald, N.** 2011. *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Horizon Scientific Press.
- Khalifeh, M. S., Amawi, M. M., Abu-Basha, E. A. y col.** 2009. Assessment of humoral and cellular-mediated immune response in chickens treated with tilmicosin, florfenicol, or enrofloxacin at the time of Newcastle disease vaccination. *Poultry Science* 88(10): 2118-2124.
- Khan, Q.S.H., Hasan, S., Sardar, R. y Anjum, M.A.** 2008. Effects of dietary garlic powder on cholesterol concentration in native Desi laying hens. *American Journal of Food Technology* (3): 207-213.
- Khan, R.U., F.R. Durrani, N. Chand y H.Anwar.** 2010. Influence of feed supplementation with *Cannabis sativa* on quality of broilers carcass. *Pakistan Veterinary Journal* 30:34-38.
- Khan, R.U., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., Naz, S., Javdani, M., Laudadio, V.** 2012. Garlic (*Allium sativum*) supplementation in poultry diets: effect on production and physiology. *Worlds Poultry Science Journal* 68(3): 417-424.
- Khoramabadi, V., Akbari, M. R., Khajali, F. y col.** 2014. Influence of xylanase and vitamin A in wheat-based diet on performance, nutrients digestibility, small intestinal morphology and digesta viscosity in broiler chickens. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 36 (4): 379-384
- Kianfar, R., Moravej, H., Shivazad, M.** 2013. The effects of dry heat processing, autoclaving and enzyme supplementation on the nutritive value of wheat for growing Japanese quails. *Journal of Applied Animal Research* 41(1): 93-102.
- Kiarie, E., Romero, L. F., Ravindran, V.** 2014. Growth performance, nutrient utilization, and digesta characteristics in broiler chickens fed corn or wheat diets without or with supplemental xylanase. *Poultry Science* 93 (5): 1186-1196.
- Kim, Y.J., S.K. Jin y H.S. Yang.** 2009. Effect of dietary garlic bulb and husk on the physicochemical properties of chicken meat. *Poultry Science* 88: 398-405.
- Kim, G.B., Seo, Y.M., Kim, C.H., Paik, I.K.** 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science* 90(1):75-82.
- Kim, Y.S., Kim, K.S., Han, I., Kim, M.H., Jung, M.H., Park, H.K.** 2012a. Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone, and in combination with antifungal drugs. *PLOS ONE* 7, e38242.
- Kim, J. S., Ingale, S. L., Kim, Y. W. y col.** 2012b. Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96(4): 618-626.

- Kim, D. K., Lillehoj, H.S., Lee, S. H. y col.** 2013. Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *British Journal of Nutrition* 109(1): 76-88.
- Kim, J.H., Kim, J.W., Lee, B.B., Lee, G.I., Lee, J.H., Kim, G.B., Kil, D.Y.** 2014. Effect of dietary supplementation of bacteriophage on growth performance and cecal bacterial populations in broiler chickens raised in different housing systems. *Livestock Science* 170: 137-141.
- Kirkpinar, F., Unlu, H. B., Serdaroglu, M. y col.** 2014. Effects of dietary oregano and garlic essential oils on carcass characteristics, meat composition, colour, pH and sensory quality of broiler meat. *British Poultry Science* 55(2): 157-166
- Klein, D.** 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8: 257–260.
- Koch, H.P., Lawson, L.D.** 1996. *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA.
- Kolida, S. y Gibson, G.R.** 2011. Synbiotics in health and disease. *Annual Reviews in Food Science and Technology* 2: 373–393.
- Kook, S., Kim, G. H., y Choi, K.** 2009. The anti-diabetic effect of onion and garlic in experimental diabetic rats: meta-analysis. *Journal of Medicinal Food* 12(3): 552-560.
- Korver, D. R.** 2012. Implications of changing immune function through nutrition in poultry. *Animal Feed Science and Technology* 173(1-2): 54-64
- Kumar, S., K. Sharadamma, y P. Radhakrishna.** 2010. Effects of garlic active based growth promoter on growth performance and specific pathogenic intestinal microbial counts of broiler chicks. *International Journal of Poultry Science* 9:244-246
- Kumar, L., Singh, P. K., Chandramoni y col.** 2013. Effect of Dietary Supplementation of Combination of Probiotics on the Growth Performance and Immune Response of Broiler Chickens. *Animal Nutrition and Feed Technology* 13 (1): 15-25.
- Kurekci, C., Al Jassim, R., Hassan, E. y col.** 2014. Effects of feeding plant-derived agents on the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poultry Science* 93(9): 2337-2346.
- Lallès, J. P., Bosi, P., Janczyk, P., Koopmans, S. J. y Torrallardona, D.** 2009. Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: a review. *Animal* 3(12): 1625-1643
- Landy, N., Ghalamkari, G.H., Toghyani, M.** 2011. Performance, carcass characteristics and immunity in broiler chicks fed dietary neem (*Melia azadirachta*) as alternative for an antibiotic growth promoter. *Livestock Science* 142: 305-309.
- Lankhorst, C., Tran, Q.D., Havenaar, R. y col.** 2007. The effect of extrusion on the nutritional value of canine diets as assessed by in vitro indicators. *Animal Feed Science and Technology* 138 (3-4): 285-2970.

- Lanzotti, V., Scala, F., Bonanomi, G.** 2014. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews* 13(4): 769-791.
- Lázaro, R., Mateos, G.G.** 2008. FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Necesidades Nutricionales para avicultura. *Normas FEDNA 2008*.
- Lee, D. N., Lyu, S. R., Wang, R. C., Weng, C. F., y Chen, B. J.** 2011. Exhibit differential functions of various antibiotic growth promoters in broiler growth, immune response and gastrointestinal physiology. *International Journal of Poultry Science* 10:216–220.
- Lee, K. y Lillehoj, H. S.** 2011. Antimicrobials, Gut Microbiota and Immunity in Chickens. *Korean Journal of Poultry Science* 38(2): 155-164.
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Lee, S.H.** 2014. Effects of salinomycin and *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses in broiler chickens. *Research Veterinary Science* 97(2):304-8.
- Lee, K-W., Kim, D. K., Lillehoj, H. S. y col.** 2015. Immune modulation by *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials in commercial broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 200: 76-85.
- Leeson, S. y Summers, J.D.** 2005. *Commercial poultry nutrition*, 3ª Edición. Nottingham, Reino Unido, Nottingham University Press.
- Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., y Zhang, H.** 2015. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 28 (2): 239-246
- Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M., Møller, K.** 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied Environmental Microbiology* 68(2):673-90.
- Lessire, M.** 2004. Sistemas para la valoración energética de los alimentos en aves. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 9(1): 35-42.
- Leverslha, M.A.** 1993. FISH and the technicolour revolution: molecular cytogenetics and its applications in chromosome analysis today. *Medical Journal of Australia* 138: 545.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S.** 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320: 1647–1651.
- Liao, X. D., Ma, G., Cai, J. y col.** 2015. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidation, and immune function of broilers. *Poultry Science* 94(4): 662-7.
- Lin, J.** 2014. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Frontiers in Microbiology* 5(33).

- Liu, Y.P., Wu, G.S., Yao, Y.G., Miao, Y.W., Luikart, G., Baig, M., Beja-Pereira A., Ding, Z.L., Gounder-Palanichamy, M. y Zhang, Y.P.** 2006. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 12–9.
- Liu, C., Finegold, S.M., Song, Y.** 2008. Reclassification of *Clostridium coccooides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccooides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp nov., isolated from human faeces. 2008. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(8): 1896-1902.
- Liu, S.Y., P.H. Selle, A.J. Cowieson.** 2013. The kinetics of starch and nitrogen digestion regulate growth performance and nutrient utilisation in coarsely-ground, sorghum-based broiler diets. *Animal Production Science* 53: 1033–1040
- Liu, S. Y., Cadogan, D. J., Peron, A. y col.** 2014. Effects of phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization and digestive dynamics of starch and protein in broiler chickens offered maize-, sorghum- and wheat-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 197: 164-175.
- Lloyd, A. B., R. B. Cumming, y R. D. Kent.** 1977. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Australian Veterinary Journal* 53:82-7.
- Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M. y Stanton, T.B.** 2012. In 66 feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(5): 1691-169.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., Lee, M.D.** 2003. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6816-6824.
- Lunedo, R., M. F. Fernandez-Alarcon, F. M. S. Carvalho, L. R. Furlan y M. Macari.** 2014. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize- or sorghum-fed broiler chickens using realtime PCR. *British Poultry Science* 55 (6): 795-803.
- Luo, Y.H., Peng, H.W., Wright, A.D., Bai, S.P., Ding, X.M., Zeng, Q.F., Li, H., Zheng, P., Su, Z.W., Cui, R.Y., Zhang, K.Y.** 2013. Broilers fed dietary vitamins harbor higher diversity of cecal bacteria and higher ratio of *Clostridium*, *Faecalibacterium*, and *Lactobacillus* than broilers with no dietary vitamins revealed by 16S rRNA gene clone libraries. *Poultry Science* 92:2358–2366.
- Lyimo, C.M., Weigend, A., Msoffe, P.L., Eding, H., Simianer, H., Weigend, S.** 2014. Global diversity and genetic contributions of chicken populations from African, Asian and European regions. *Animal Genetics* 45(6):836-48.

- Machado, P. C., Beirao, B. C. B., Fernandes F. T. y col.** 2014. Use of blends of organic acids and oregano extracts in feed and water of broiler chickens to control *Salmonella Enteritidis* persistence in the crop and ceca of experimentally infected birds. *Journal of Applied Poultry Research* 23(4): 671-682.
- Mackie, R. I.** 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: Diversity and evolution. *Integrative and Comparative Biology* 42:319-326.
- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente,** 2013. *Caracterización del Sector Avícola de la Carne, 2012.*
- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente,** 2014. *El Sector de la carne de ave en cifras, 2013.*
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T. y Palva, A.** 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5 ζ -nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149: 269–277.
- Mallet, A.C.T., Cardoso, M.G., Souza, P.E. y col.** 2015. Chemical characterization of the *Allium sativum* and *Origanum vulgare* essential oils and their inhibition effect on the growth of some food pathogens. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16(4): 804-811.
- Mandalawi, H.A. Kimiaetalab, M.V., Obregon, V., Menoyo, D., Mateos, G.G.** 2014. Influence of source and level of glycerin in the diet on growth performance, liver characteristics, and nutrient digestibility in broilers from hatching to 21 days of age. *Poultry Science* 93(11): 2855-2863.
- Mansoub, N.H., Nezhady, M. A.M.** 2011. Effect of garlic, thyme and yogurt compared to antibiotics on performance, immunity and some blood parameters of broiler chickens. *Indian Journal of Animal Sciences*: 81 (12): 1197-1200.
- Martel, A., L. A. Devriese, K. Cauwerts, K. De Gussem, A. Decostere, y F. Haesebrouck.** 2004. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology* 33:3–7.
- Masey-O'Neill, H. V., Singh, M., Cowieson, A. J.** 2014. Effects of exogenous xylanase on performance, nutrient digestibility, volatile fatty acid production and digestive tract thermal profiles of broilers fed on wheat- or maize-based diet. *British Poultry Science* 55(3): 351-359
- Maslowski, K.M., y Mackay, C.R.** 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Natural Immunology* 12:5-9.
- Mateos, G.G., Lázaro, R., González- Alvarado, J.M., Jiménez, E. y Vicente, B.** 2006a. *Efectos de la fibra dietética en pienso de iniciación para pollitos y lechones.* FEDNA 22: 39-66.
- Mateos, G.G., Pérez Serrano, M., Hermida, M., Romero, C. y Patón, F.** 2006b. *Reevaluación del contenido en minerales de las materias primas.* FEDNA 22: 217-241
- Mateos, G.G., Jiménez-Moreno, E., González- Alvarado, J.M. y Valencia, D.G.** 2007. *Alimentación del pollito de carne durante la primera semana de vida.* FEDNA 23: 65-92

Mateos, G.G., Guzmán, P., Saldaña, B., Lázaro., R. 2013. *Poultry Production in Spain: New Advances in Feeding and Nutrition Practice*. Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Madrid.

Maynard, L. 1986. *Nutrición Animal*. Ed. México: McGraw-Hill.

McLelland, J. 1989. Anatomy of the avian cecum. *Journal of Experimental Zoology Supplement* 3:2-9.

McWhorter, T.J., Caviedes-Vidal, E., Karasov, W.H. 2009. The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. *Biological Reviews* 84: 533–565.

Mead, G. C. 1997. Bacteria in the Gastrointestinal Tract of Birds, p. 216-240. In R. I. Mackie, B. A. White, and R. E. Isaacson (ed.), *Gastrointestinal Microbiology*. Champman & Hall, New York.

Mead, G.C. 2004. Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science* 6(3): 135–142.

Melero B., R. Vinuesa, A. M. Diez, I. Jaime , y J. Rovira. 2013. Application of protective cultures against *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in chicken products packaged under modified atmosphere. *Poultry Science* 92:1108–1116

Melvin, J.M., Jayochitra, J., Vijayapriaya, M. 2009. Antimicrobial activity of some common spices against certain human pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research* 3: 1134-1136.

Milner, J.A. 1996. Garlic: Its Anticarcinogenic and Antitumorigenic Properties. *Nutrition Reviews* 54: A82–S86.

Milner, J.A. 2001. A Historical Perspective on Garlic and Cancer. *Journal of Nutrition* 131: 1027S–1031S.

Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M., Weiner, L. 2000. The mode of action of allicin: Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica and Biophysica Acta Biomembranes* 1463: 20–30.

Mitchell, M.A., Moretó, M. 2006. Absorptive function of the small intestine: Adaptations meeting demand. *Avian Gut Function in Health and Disease*. 4. Editorial G.C. Perry CAB International.

Mitsch, P., K. Zitterl- Eglseder, B. Kohler, C. Gabler, R. Losa and I. Zimpernik. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science* 83: 669-675

Mnayer, D., Fabiano-Tixier, A-S., Petitcolas, E. y col. 2014. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the *Alliaceae* Family. *Molecules* 19(12): 20034-20053.

Mohammadi, Z., Ghazanfari, S., Moradi, M. A. 2014. Effect of supplementing clove essential oil to the diet on microflora population, intestinal morphology, blood parameters and performance of broilers. *European Poultry Science* 78. DOI: 10.1399/eps.2014.51.

Montagne, L., Créviu-Gabriel, I., Toullec, R., Lallès, J.P. 2003. Influence of dietary protein level and source on the course of protein digestion along the small intestine of the veal calf. *Journal of Dairy Science* 86(3):934-43.

Mora, I. 2002. *Nutrición Animal*. S.E. 13-29. Editorial: Edunet. Zaragoza. España.

Morishita, T. Y., Aye, P. P., Harr, B. S., Cobb, C. W., Clifford, J. R. 1997. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Diseases* 41:850-855.

Mountzouris, K.C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Fegeros, K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science* 86(2):309-17.

Mountzouris, K. C., Palamidi, I., Tsirtsikos, P. y col. 2015. Effect of dietary inclusion level of a multi-species probiotic on broiler performance and two biomarkers of their caecal ecology. *Animal Production Science* 55(4): 484-493.

Munir, K., Muneer, M. A., Tiwari, A. y col. 2007. Effects of polyether ionophores on the protective immune responses of broiler chickens against angara disease and newcastle disease viruses. *Veterinary Research Communications* 31 (7): 909-929.

Murakami, A. E., Eyng, C., Torrent, J. 2014. Effects of Functional Oils on Coccidiosis and Apparent Metabolizable Energy in Broiler Chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27(7): 981-989.

Muramatsu, T., S. Nakajima, J. Okumura. 1994. Modification of energy metabolism by the presence of the gut microflora in the chicken. *British Journal of Nutrition* 71: 709-717

Murphy, T. C., Mccracken, J. K., McCann, M. E. E. y col. 2009. Broiler performance and in vivo viscosity as influenced by a range of xylanases, varying in ability to effect wheat in vitro viscosity. *British Poultry Science* 50(6): 716-724

Murugesan, G. R., Gabler, N. K., Persia, M. E. 2014. Effects of direct-fed microbial supplementation on broiler performance, intestinal nutrient transport and integrity under experimental conditions with increased microbial challenge. *British Poultry Science* 55(1): 89-97.

Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2(3):317-22.

Mwacharo, J.M., Bjørnstad, G., Han, J.L. y Hanotte, O. 2013. The history of African village chickens: an archaeological and molecular perspective. *African Archaeological Review* 30: 97–114.

Mwangi, W. N., R. K. Beal, C. Powers, X. Wu, T. Humphrey, M. Watson, M. Bailey, A. Friedman, y A. L. Smith. 2010. Regional and global changes in TCRαβ T cell repertoires in the

gut are dependent upon the complexity of the enteric microflora. *Developmental and Comparative Immunology* 34:406–417.

Myers, R.M., T. Maniatis y L.S. Lerman. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527

Nanekarani, S., Goodarzi, M., Heidari, M., Landy, N. 2012. Efficiency of ethanolic extract of peppermint (*Mentha piperita*) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2: S1611-S1614.

National Research Council. 1994. *Nutrient requirements of poultry*, 9.^a Edición revisada. National Academy Press, Washington DC.

Nabizadeh, A. 2012. The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora, gut morphology, and performance. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21 (4): 725-734.

Newall, C. A., Anderson, L. A. Phillipson, J. D. 1996. *Herbal medicines: a guide for health-care professionals*. Pharmaceutical Press. London.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports* 17: 215–234.

Newton, C. y Graham, A. 1997 (Second Edition). *PCR*. Springer. N. York.

Nicholson, J. K., E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia, y S. Pettersson. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336:1262–1267.

Niewold, T. A. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science* 86: 605-609.

Nitsan, Z. 1995. The development of digestive tract in posthatched chicks. *European Symposium on Poultry Nutrition*.

Northcutt, J.K., Berrang, M.E., Dickens, J.A., Fletcher, D.L., Cox, N.A. 2003. Effect of broiler age, feed withdrawal, and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. *Poultry Science* 82: 169-173.

Norzaharaini, M., W. S. Norshazwani, A. Hasmah, N. Norlzani y S. Rapeah. 2011. A preliminary study on the antimicrobial activities of asiaticoside and asiatic acid against selected gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Environmental Health* 2:23-26.

Noy, Y. y D. Sklan. 1997. Post hatch development in poultry. *Journal of Applied Poultry Research*. 6:344–354.

Noy, Y. y D. Sklan. 1998. Are metabolic responses affected by early nutrition? *Journal of Applied Poultry Research* 7:437–451

Noy, Y., A. Geyra y D. Sklan. 2001. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. *Poultry Science* 80:912–919.

Oakley, B. B., Buhr, R. J., Ritz, C. W. y col. 2014. Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. *BMC Veterinary Research* 10(282).

Obst, B. S., y J. Diamond, 1992. Ontogenesis of intestinal nutrient transport in domestic chickens (*Gallus gallus*) and its relation to growth. *Auk* 109:451–464

OECD-FAO. 2014. Organization for Economic Co-operation and Development and Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Perspectivas Agrícolas 2014- 2023*.

OIE, 2013. Organización Mundial de Sanidad Animal.
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Zoonoses

Olukosi, O. A., Adeola, O. 2010. Metabolizable Energy Content of Meat and Bone Meal in Corn-Soybean Meal or Corn, Wheat and Soybean Meal Diets for Broilers. *Journal of Poultry Science* 47(3): 244-249.

Olukosi, O.A. y N. D. Dono. 2014. Modification of digesta pH and intestinal morphology with the use of benzoic acid or phytobiotics and the effects on broiler chicken growth performance and energy and nutrient utilization. *Journal of Animal Science* 92:3945-3953.

OMS, Organización Mundial de la Salud. 2000. WHO Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food. Pages 1,23 in *Document WHO/CDS/CSR/APH/2000.4*. WHO, Geneva, Switzerland.

OMS, Organización Mundial de la Salud. 2005. *Campylobacter. Fact sheet N° 255*.

Osman, K. M., Elhariri, M. 2013. Antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* isolates from broiler chickens in Egypt. *Revue Scientifique et Technique- Office International des Epizooties* 32(3): 841-850.

Osorio-Carmona, E., Giraldo-Carmona, J. Narváez-Solarte, W. 2012. Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria y Zootecnia* 6(1): 87-97.

Oviedo-Rondón, E. O., M. E. Hume, C. Hernandez, y S. Clemente-Hernandez. 2006. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. *Poultry Science* 85:854-60.

Oviedo-Rondón, E.O. 2009. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. *Brazilian Journal of Animal Science* 38:209-225.

Owens, F.N., Hanson, C.F. 1992. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Dairy Science* 75(9):2605-17.

Page, S. W. 2006. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits. Pages 19–51 in *Antimicrobial Growth Promoters: Where Do We Go from Here?* D.

Barug, J. de Jong, A. K. Kies, and M. Verstegen, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

Park, J.H. y Kim, I.H. 2014. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poultry Science* 93(8):2054-9.

Pasteur, L. 1858. Memoire sur la fermentation appelee lactique. *Memoires de la Societe royale des sciences, de l'agriculture et des arts, de Lille* 5: 13–26.

Pasteur, L. 1880. Sur les maladies virulentes et en particulier sur la maladie appele'e vulgairement chole'ra des poules. *Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences* 90:242–248.

Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Journal of Molecular Diagnostics* 6:313–321

Peinado, MJ., Ruiz, R., Echávarri, A., Rubio, L.A. 2012. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*. *Poultry Science* 91(9):2148-57.

Peinado, M.J., Ruiz, R., Echávarri, A., Aranda, I., Rubio, L. A. 2013a. Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves performance in broilers. *Animal Feed Science Technology* 181: 87- 92.

Peinado, M.J., Echávarri, A., Ruiz, R., Suárez-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J.M., Rubio, L.A. 2013b. Effects of inulin and di-D-fructose dianhydride-enriched caramels on intestinal microbiota composition and performance of broiler chickens. *Animal* 7(11):1779-88.

Persia, M. E., Young, E. L., Utterback, P. L. y Parsons, C. M. 2006. Effects of dietary ingredients and *Eimeria acervulina* infection on chick performance, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. *Poultry Science* 85:48-55.

Pokusaeva, K., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition* 6(3): 285-306.

Pond, W. G., H. G. Jung, y V. H. Varel. 1988. Effect of dietary fiber on young adult genetically lean, obese and contemporary pigs: Body weight, carcass measurements, organ weights and digesta content. *Journal of Animal Science* 66:699–706.

Pourabedin, M., Xu, Z.X., Baurhoo, B., Chevaux, E., Zhao, X. 2014. Effects of mannan oligosaccharide and virginiamycin on the cecal microbial community and intestinal morphology of chickens raised under suboptimal conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 60(5): 255-266.

Pourali, M., S. Mirghelenj y H. Kermanshahi. 2010. Effects of garlic powder on productive performance and immune response of broiler chickens challenged with Newcastle Disease virus. *Global Veterinary* 4:616-612.

- Pourhossein, Z., Qotbi, A. A. A., Seidavi, A. y col.** 2015. Effect of different levels of dietary sweet orange (*Citrus sinensis*) peel extract on humoral immune system responses in broiler chickens. *Animal Science Journal* 86(1): 105-110.
- Prescott, J. F.** 1979. The prevention of experimentally induced necrotic enteritis in chickens by avoparcin. *Avian Diseases* 23:1072–1074.
- Puerta, C.J., Ureña, C.P.** 2005. *Prácticas de biología molecular*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Purwanti, S., Zuprizal, Yuwanta, T. y Supadmo.** 2014. Duodenum Histomorphology and Performance as Influenced by Dietary Supplementation of Turmeric (*Curcuma longa*), Garlic (*Allium sativum*) and its Combinations as a Feed Additive in Broilers. *International Journal of Poultry Science* 13 (1): 36-41.
- Puvaca, N., Stanacev, V., Glamocic, D. y col.** 2013. Beneficial effects of phytoadditives in broiler nutrition. *Worlds Poultry Science Journal* 69 (1): 27-34.
- Qiao, L., Chen, Y., Wen, C. y col.** 2015. Effects of natural and heat modified palygorskite supplementation on the laying performance, egg quality, intestinal morphology, digestive enzyme activity and pancreatic enzyme mRNA expression of laying hens. *Applied Clay Science* 104: 303-308.
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W. J. Donnelly y F.C. Leonard.** 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 1st Edition, Wiley-Blackwell Science, USA., ISBN-13: 978-0632055258, Pages: 544.
- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wichek, M., Mirelman, D., Weiner, L.** 1998. The Mode of Action of Allic: Trapping of Radicals and Interaction with Thiol-Containing Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1379: 233–234.
- Rabinowitch, H.D., Currah, L.** 2002. *Allium Crop Science: Recent Advances*; CABI Publishing: Wallingford, UK.
- Radwan, N., R.A., Hassan, E.M., Qota y H.M., Fayek.** 2008. Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *International Journal of Poultry Science* 7: 134-150.
- Rahman, M.S. y G.M. Lowe.** 2006. Garlic and cardiovascular disease: A Critical Review. *The Journal of Nutrition* 136: 736S-740S.
- Rahman, M.S.** 2007. Allicin and other functional active components in garlic: health benefits and bioavailability. *International Journal of Food Properties* 10: 245-268.
- Rajput, N., Muhammad, N., Yan, R. y col.** 2013. Effect of Dietary Supplementation of Curcumin on Growth Performance, Intestinal Morphology and Nutrients Utilization of Broiler Chicks. *Journal of Poultry Science* 50(1): 44-52.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229–241.

Ramiah, S.K., Zulkifli, I., Rahim, N.A.A., Ebrahimi, M. y Meng, G.Y. 2014. Effects of Two Herbal Extracts and Virginiamycin Supplementation on Growth Performance, Intestinal Microflora Population and Fatty Acid Composition in Broiler Chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 27: 375-382

Ravindran, V. y Bryden, W.L. 1999. Amino acid availability in poultry – in vitro and in vivo measurements. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 889–908.

Ravindran, V., Abdollahi, M.R. y Bootwalla, S.M. 2014. Nutrient analysis, metabolizable energy, and digestible amino acids of soybean meals of different origins for broilers. *Poultry Science* 93: 2567–2577.

Redig, P. 1989. The avian ceca: obligate combustion chambers or facultative afterburners?—The conditioning influence of diet. *Journal of Experimental Zoology*. Supplement 3: 66–69.

Redondo, L.M., Redondo, E.A., Delgado, F., LaSala, L., Pereyra, A., Garbaccio, S. y col. 2013. Control of *Clostridium perfringens* necrotic enteritis by tannins added to the diet. *Proceedings of the 8th International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia (ClostPath8)*, Vol.5.Palm Cove.

Redondo, L. M., Chacana, P.A., Dominguez, J.E. y Fernandez Miyakawa, M.E. 2014. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in Microbiology* 5: 118.

REGA, Registro General de Explotaciones Ganaderas, 2013. *El Sector de la carne de ave en cifras, 2012.*

Regulation (EC) no 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

Regulation (EC) No 767/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed, amending European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC

and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

Rehman, H., C. Rosenkranz, J. Bohm y J. Zentek. 2007. Dietary inulin affects the morphology but not the sodium-dependent glucose and glutamine transport in the jejunum of broilers. *Poultry Science* 86:118–122.

Reischl, U., Wittwer, C.T. y Cockerill, F. 2002. Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications; *Microbiology and Food Analysis*. New York: Springer-Verlag.

Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M.A., Tanaka, R., Watanabe, K. and Tannock, G.W. 2002. Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2420–2427.

Rinttilä, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogus y A. Palva. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1166–1177

Rinttilä, T. y Apajalahti, J. 2013. Intestinal microbiota and metabolites-Implications for broiler chicken health and performance. *Journal of Applied Poultry Research* 22(3): 647-658.

Ritzi, M.M., Abdelrahman, W., Mohnl, M. y col. 2014. Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poultry Science* 93 (11): 2772-2778.

Robinson, C. J. y Young, V. B. 2010. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* 1: 279–284

Rodicio, M.R., Mendoza, M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(4).

Rodríguez, N.M., Oliveira, E., Guimarães, R. 2007. Use of parameters for estimation of forage consumption and digestibility. Purified enriched lignin, LIPE. *Colombian Journal of Animal Science and Veterinary Medicine* 20(4).

Rodríguez, L.M., Rebole, A., Velasco, S. y col. 2012. Wheat- and barley-based diets with or without additives influence broiler chicken performance, nutrient digestibility and intestinal microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(1): 184-190.

Roul, G., Panda, N., Mishra, P. K. y col. 2013. Effect of Pro- and Pre-biotic Supplementation on Growth and Immune Status of Broilers During Summer. *Animal Nutrition and Feed Technology* 13(2): 261-270.

Roul, G., Panda, N., Mishra, P. K. y col. 2015. Effect of supplementation of probiotics and prebiotics on growth, lipid profile and slaughter traits of coloured broilers during heat stress. *Indian Journal of Animal Sciences* 85(1): 72-76.

- Rubio, L.A.** 2005. Ileal digestibility of defatted soybean, lupin and chickpea seed meals in cannulated Iberian pigs: I. Proteins. *Journal of the science of food and agriculture* 85(8): 1313-1321
- Ruiz, R., M.P. García, A. Lara, L.A. Rubio.** 2010. Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Veterinary Microbiology* 144: 110–117.
- Ruiz, R., Barroso-Del Jesús, A., Lara, L., Rubio, L.A.** 2015a. The use of multiple restriction enzymes in T-RFLP analysis and identification of performance-related cecal bacterial groups in growing broiler chickens. DOI: 10.1017/S0021859615000611.
- Ruiz, R., Peinado, M.J., Aranda-Olmedo, I., Abecia, L., Suárez-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J.M., Rubio, L.A.** 2015b Effects of feed additives on ileal mucosa-associated microbiota composition of broiler chickens. *Journal of Animal Science* 93(7): 3410-3420.
- Russell, D.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C.** 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food microbiology* 149:88-105.
- Sahin, K., N. Sahin, M. Sari, M.F. Gursu.** 2002. Effects of vitamins E and A supplementation on lipid peroxidation and concentration of some mineral in broilers reared under heat stress (32 °C). *Nutrition Research* 22: 723–731.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N.** 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350
- Sakomura, N.K., Longo, F.A., Oviedo-Rondon, E.O., Boa-Viagem, C., Ferraudo, A.** 2005. Modeling energy utilization and growth parameter description for broiler chickens. *Poultry Science* 84:1363-1369.
- Saleh, A.A., Khairy, A., El-Magd, M.A., Atta, M.S. Mohammed, A.A., Ragab, M.M., Abd El-Kader, H.** 2014. Integrative effects of feeding *Aspergillus awamori* and fructooligosaccharide on growth performance and digestibility in broilers: promotion muscle protein metabolism. *BioMed Research International* 2014: 946859.
- Salim, H.M., Kang, H.K., Akter, N., Kim, D.W., Kim, J.H., Kim, M.J., Na, J.C., Jong, H.B., Choi, H.C., Suh, O.S., Kim, W.K.** 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry Science* 92(8):2084-90.
- Salminen, S. y Isolauri, E.** 2006. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *Journal of Pediatrics* 149: S115–S120.
- Salzman, N.H.** 2011. Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Current Opinion in Microbiology* 14: 99–105.
- Sambrook, Frisch, F.E, Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning; a laboratory manual*. Planinview, NY, 1989, Cord Spring Harbor Laboratory Press.

- Samuel, B. S. y Gordon, J. I.** 2006. A humanized gnotobiotic mouse model of host–archaeal–bacterial mutualism. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 103: 10011–10016
- Sang-Oh, P. y Byung-Sung, P.** 2011. Effect of Dietary Microencapsulated-Inulin on Carcass Characteristics and Growth Performance in Broiler Chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10(10): 1342-1349.
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D., Biavati, B.** 2012. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology* 141(1):S98-108.
- Santomá, G., Pérez de Ayala, P., y A. Gutiérrez del Álamo.** 2006. *Producción de broilers sin antibióticos promotores del crecimiento. Conocimientos actuales.* Documento sección española WPSA (World's Poultry Science Association).
- Sarica, S., A. Ciftci, E., Demir, K., Kilinc y Y.Yildirim.** 2005. Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without exogenous enzymes in wheat based broiler diets. *South African Journal of Animal Science* 35: 61-72.
- Sawai, H., Kim, H.L., Kuno, K., Suzuki, S., Gotoh, H., Takada, M., Takahata, N., Satta Y. and Fumihito, A.** 2010. The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to Junglefowls *Gallus g. gallus* and *G. varius*. *PLoS ONE* 5, e10639.
- Scallan, Elaine., Robert M. Hoekstra, Frederick J. Angulo, Robert V. Tauxe, Marc-Alain Widdowson, Sharon L. Roy, Jeffery L. Jones, and Patricia M. Griffin.** 2011. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17: 1338.
- Scanes, C.G., Brant, G. y Ensminger, M.E.** 2004. *Poultry Science* Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall, New Jersey, EE.UU.
- Schlegel, H.G.** 2004. Continuing opportunities for general microbiology. *Archives of Microbiology* 182:105-8.
- Schachtschneider, K.M., Yeoman, C. J., Isaacson, R. E. y col.** 2013. Modulation of Systemic Immune Responses through Commensal Gastrointestinal Microbiota. *PLOS ONE* 8(1)
- Schmidt, P.Q. y Marquardt, U.** 1936. Über den antimykotischen Effekt ätherischer Öle von lauchgewäshen und kreuzblütern auf pathogene Hautplize. *Zentralblate für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 138: 104–128.
- Schotte, U., Truyen, U., Neubauer, H.** 2004. Significance of beta 2-toxigenic Clostridium perfringens infections in animals and their predisposing factors - A review. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 51 (10): 423-426.
- Scott, T.A., Boldaji, F.** 1997. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (Celite)] for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley-based broiler diets with or without enzymes. *Poultry Science* 76:594-8.

- Scupham, A.J.** 2009. Campylobacter colonization of the Turkey intestine in the context of microbial community development. *Applied and Environmental Microbiology* 75:3564–3571.
- Seal, B.S., Lillehoj, H.S., Donovan, D.M. y Gay, C.G.** 2013. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Animal Health Research Reviews* 14:78–87.
- Secombe, C.J. y Lester, G.D.** 2012. The role of diet in the prevention and management of several equine diseases. *Animal Feed Science and Technology* 173:86-101.
- Sekelja, M., Rud, I., Knutsen, S.H., Denstadli, V., Westereng, B., Naes, T., Rudi, K.** 2012. Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin. *Applied and Environmental Microbiology* 78:2941–2948
- Selim, A.S.M., Boonkumklao, P., Sone, T., Assavanig, A., Wada, M. y Yokota, A.** 2005. Development and assessment of a real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of a novel thermotolerant bacterium, *Lactobacillus thermotolerans*, in chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4214–4219
- Sell, J. L., C. R. Angel, F. J. Piquer, E. G. Mallarino y H. A. Al-Batshan.** 1991. Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. *Poultry Science* 70:1200-5.
- Sen, S., Ingale, S. L., Kim, Y. W. y col.** 2012. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science* 93(1): 264-268.
- Senior, K.** 2009. Estimating the global burden of foodborne disease. *The Lancet Infectious Diseases* 9(2): 80–81.
- 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* 21 9(3): e91941.
- Shakouri, M.D., Iji, P.A., Mikkelsen, L.L., Cowieson, A.J.** 2009. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93: 647–658.
- Shamoto, K. y K. Yamauchi.** 2000. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poultry Science* 79:718-723.
- Sharifi, S. D., Dibamehr, A., Lotfollahian, H., y col.** 2012. Effects of flavomycin and probiotic supplementation to diets containing different sources of fat on growth performance, intestinal morphology, apparent metabolizable energy, and fat digestibility in broiler chickens. *Poultry Science* 91(4): 918-927.
- Sharifi, S. D., Golestani, G., Yaghobfar, A. y col.** 2013. Effects of supplementing a multienzyme to broiler diets containing a high level of wheat or canola meal on intestinal morphology and performance of chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 22(4): 671-679

- Sharma, V.D., Sethi, M.S., Kumar, A., Rarota, J.R.** 1977. Antibacterial Property of *Allium Sativum* Linn., *in Vivo* and *in Vitro* Studies. *Indian Journal of Experimental Biology* 15: 446.
- Shimada, M.** 2005. *Nutrición animal*, S.E. Editorial Trillas, México, 18-35.
- Silvio, J., Harmon, D.L., Gross, K.L. y col.** 2000. Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. *Basic Nutritional Investigation* 16 (4): 289-295.
- Simonetti, G.** 1990. In: *Schuler, S. Ed. Simon & Schuster's Guide to Herbs and Spices (Nature Guide Series)*. Inc. New York. pp: 261-262.
- Singh, K.M., Shah, T., Deshpande, S., Jakhesara, S.J., Koringa, P.G., Rank, D.N., Joshi, C.G.** 2012. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Molecular Biology Reports* 39:10595-10602
- Singh, P., Karimi, A., Devendra, K. y col.** 2013. Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. *Poultry Science* 92(1): 272-276
- Singh, Y., A. M. Amerah, y V. Ravindran.** 2014. Whole grain feeding: Methodologies and effects on performance, digestive tract development and nutrient utilisation of poultry. *Animal Feed Science and Technology* 190:1–18.
- Singh, J., Sethi, A. P. S., Sikka, S. S. y col.** 2015. Effect of sun dried whole bulb garlic powder on growth, carcass characteristics and meat quality of commercial broilers. *Indian Journal of Animal Sciences* 85(1): 67-71.
- Slavić, D., P. Boerlin, M. Fabri, K. C. Klotins, J. K. Zoethout, P. E. Weir, y D. Bateman.** 2011. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research* 75:89–97.
- Slominski, B. A.** 2011. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science* 90(9): 2013-2023.
- Slyranda, B. A., I. A. Y. Kennedy, B. N. Joel, A. Auwal, A. Usman, A. I. Muhammed, A. Haruna, M. B. Mohammed, M. I. Hama'Adama, y T. N. Patric.** 2011. Effects of feeding onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) on some performance characteristics of broiler chickens. *Research Journal of Poultry Sciences* 4:22-27.
- Small, L.D., Bailey, J.H., Cavallito, C.J.** 1947. Alkyl Thiosulfinates. *Journal of American Chemical Society* 69: 1710–1713.
- Smith, C.H.M. y Annison, G.** 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition-towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultry Science Journal* 52: 203–221.
- Smith, D. P. y M. E. Berrang.** 2006. Prevalence and numbers of bacteria in broiler crop and gizzard contents. *Poultry Science* 85:144-7.
- Smith, C.J. y Osborn, A.M.** 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 67(1):6-20.

- Snel, J., H.J.M. Harmsen, P.W., J.J., Van der Wielen y B.A. Williams.** 2002. *Nutrition and health of the gastrointestinal tract*. Wageningen Academic Publishers The Netherlands. 1ª Edición.
- Sofka, D., Pfeifer, A., Gleiss, B. y col.** 2015. Changes within the intestinal flora of broilers by colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 128 (3-4): 104-110.
- Solis de los Santos, F., M. B. Farnell, G. Tellez, J. M. Balog, N. B. Anthony, A. Torres-Rodriguez, S. Higgins, B. M. Hargis y A. M. Donoghue.** 2005. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. *Poultry Science* 84:1092-100.
- Song, J., Xiao, K., Ke, Y. L. y col.** 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science* 93(3): 581-588.
- Songer, J.G.** 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 9(2):216-34.
- Spillman, W. J.** 1909. Barring in Barred Plymouth Rocks. *Poultry* 5:7-8.
- Stanacév, V., Kovcin, S., Stanacév, E.V., Pucarevic, M. y Puvaca A, N.** 2011. Extruded canola seed in improving chicken fattening and fatty acid composition. *Kuwait Journal of Science and Engineering* 38: 71-80
- Stanley, V.G., C. Gray, M. Daley, W.F. Krueger y A.E. Sefton.** 2004. An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* sp. infected litter. *Poultry Science* 83: 39-44.
- Stanley, D., Keyburn, A.L., Denman, S.E., Moore, R.J.** 2012. Changes in the caecal microflora of chickens following *Clostridium perfringens* challenge to induce necrotic enteritis. *Veterinary Microbiology* 159(1-2):155-62.
- Stanley, D., Hughes, R.J., Moore, R.J.** 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(10): 4301-4310.
- Stanley, D., Geier, M.S., Chen, H. y col.** 2015. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiology* 15 (1): 388.
- Stanton, T.B. y Humphrey, S.B.** 2011. Persistence of antibiotic resistance: evaluation of a probiotic approach using antibiotic-sensitive *Megasphaera elsdenii* strains to prevent colonization of swine by antibiotic-resistant strains. *Applied and Environmental Microbiology* 77(20): 7158-7166.
- Starr, M. P. y D. M. Reynolds.** 1951. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Proceedings of the 51st General Meeting, Society of American Bacteriology*, (Pages 15-34) Chicago, IL.

- Stein, H.H., Fuller, M.F., Moughan, P.J. y col.** 2007. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. *Livestock Science* 109:282-285.
- Stern, C.D.** 2004. The chick embryo-past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanisms of Development* 121: 1011–1013.
- Stern, C. D.** 2005. The chick: A great model system becomes even greater. *Developmental Cell* 8:9–17.
- Storey, A.A., Athens, S.J., Bryant, D. y col.** 2012. Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PLoS ONE* 7(7): e39171.
- Sun, H., Tang, J., Yao, X. y col.** 2013a. Effects of dietary inclusion of fermented cottonseed meal on growth, cecal microbial population, small intestinal morphology, and digestive enzyme activity of broilers. *Tropical Animal Health and Production* 45(4): 987-993.
- Sun, H., Tang, J. W., Fang, C. L. y col.** 2013b. Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal. *Poultry Science* 92 (2): 392-401.
- Swiatkiewicz, S., Arczewska-Wlosek, A.** 2012. Prebiotic fructans and organic acids as feed additives improving mineral availability. *Worlds Poultry Science Journal* 68(2): 269-279
- Swiatkiewicz, S., Swiatkiewicz, M., Arczewska-Wlosek, A., Jozefiak, D.** 2014. Chitosan and its oligosaccharide derivatives (chito-oligosaccharides) as feed supplements in poultry and swine nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99(1): 1-12
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. y Benno, Y.** 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2766–2774.
- Tanaka, S., Haruma, K, Kunihiro, M., Nagata, S., Kitadai, Y., Manabe, N., Sumii, M., Yoshihara, M., Kajiyama, G., and Chayama, K.** 2004. Effects of aged garlic extract (AGE) on colorectal adenomas: a double-blinded study. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 53(3-4): 39- 45.
- Tang, Z., Wen, C., Li, P. y col.** 2014a. Effect of Zinc-Bearing Zeolite Clinoptilolite on Growth Performance, Nutrient Retention, Digestive Enzyme Activities, and Intestinal Function of Broiler Chickens. *Biological Trace Element Research* 158 (1): 51-57.
- Tang, Y., Underwood, A., Gielbert, A. y col.** 2014b. Metaproteomics Analysis Reveals the Adaptation Process for the Chicken Gut Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 80(2): 478-485.
- Tatara, M.R., Sliwa, E., Dudek, K. y col.** 2008. Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. *Annal of Agricultural and Environmental Medicine* 15 (1): 63-69.
- Tattelman, E.** 2005. Health effect of garlic. *American Family Physician* 72: 103-106.

- Tekeli, A., H.R. Kutlu y L. Celik.** 2011. Effects of *Z.officinale* and *propolis* extracts on the performance, carcass and some blood parameters of broiler chicks. *Current Research in Poultry Science* 1: 12-23.
- Tellez, G., Latorre, J.D., Kuttappan, V.A., Kogut, M.H., Wolfenden, A., Hernandez-Velasco, X., Hargis, B.M., Bottje, W.G., Bielke, L.R., Faulkner, O.B.** 2014. Utilization of rye as energy source affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition, and bone mineralization in broiler chickens. *Frontiers in Genetics* 5:339.
- Theron, M. y Lues, J.** 2007. Organic acids and food preservation: A review. *Food Reviews International* 23: 141-158
- Tillman, G.E., Haas, G.J., Wise, M.G., Oakley, B., Smith, M.A., Siragusa, G.R.** 2011. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FEMS Microbiology Ecology* 77(2):395-403.
- Titgemeyer, E.C.** 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*. 75:2235-2247.
- Tixier-Boichard, M., Bed'hom, B. y Rognon, X.** 2011. Chicken domestication: from archaeology to genomics. *Comptes Rendus Biologies* 334: 197–204.
- Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A.A., Ghalamkari, G.H., Mohammadrezaei, M.** 2010. Growth performance, serum biochemistry, and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). *Livestock Science* 129: 173-178.
- Torok, V.A., Ophel, K.K., Loo, M., Hughes, R.J.** 2008. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Applied Environmental Microbiology* 74:783–91.
- Torok, V.A., Allison, G.E., Percy, N.J., Ophel-Keller, K., Hughes, R.J.** 2011a. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Applied Environmental Microbiology* 77(10):3380-90.
- Torok, V.A., Hughes, R.J., Mikkelsen, L.L., Perez-Maldonado, R., Balding, K., McAlpine, R., Percy, N.J., Ophel-Keller, K.** 2011b. Identification and characterization of potential performance related gut microbiota in broiler chickens across various feeding trials. *Applied Environmental Microbiology* 77:5868–5878
- Tosi, G., Massi, P., Antongiovanni, M., Buccioni, A., Minieri, S., Marenchino, L. y col.** 2013. Efficacy test of a hydrolysable tannin extract against necrotic enteritis in challenged broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science* 12:123–132.
- Trio, P.Z., You, S.X., He, X., He, J.H., Sakao, K.Z., Hou, D.X.** 2014. Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. *Food and Function* 5 (5): 833-844

- Tsiouris, V., Georgopoulou, I., Batzios, C. y col.** 2015. High stocking density as a predisposing factor for necrotic enteritis in broiler chicks. *Avian pathology: Journal of the W.V.P.A* 44(2): 59-66.
- Tsirtsikos, P., Fegeros, K., Balaskas, C. y col.** 2012. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. *Poultry Science* 91 (8): 1860-1868.
- Ubeda, C. y Pamer, E.G.** 2012. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology* 33(9): 459-466.
- Uchida, Y., T. Takahashi, y N. Sato.** 1975. The characteristics of the antibacterial activity of garlic. *The Japanese Journal of Antibiotics* 28:638–642.
- Uni, Z., Ganot, S. y Sklan, D.** 1998. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science* 77: 75-82.
- Uni, Z., Y. Noy, y D. Sklan.** 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poultry. *Poultry Science* 78:215–222
- Unno, T., Kim, J-M., Guevarra, R. B y col.** 2015. Effects of antibiotic growth promoter and characterization of ecological succession in Swine gut microbiota. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(4): 431-8.
- USDA, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y Grupo de Expertos de los Comités consultivos para la UE.** 2014. *El Sector de la carne de ave en cifras, 2013.*
- Vahjen, W., K. Glaser, K. Schafer y O. Simon.** 1998. Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *Journal of Agricultural Science* 130:489.
- Valasek, M.A., Repa, J.J.** 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29: 151–159.
- Van de Graaff, K. M.** 1986. Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract. *Pediatric Infectious Disease Journal* 5:S11-6.
- Van den Abbeele, P., Belzer, C., Goossens, M. y col.** 2013. Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME Journal* 7(5): 949-961
- Vandeplass, S., Marcq, C., Dubois Dauphin, R., Beckers, Y., Thonart, P., y Théwis, A.** 2008. Contamination of poultry flocks by the human pathogen *Campylobacter spp* and strategies to reduce its prevalence at the farm level. *BASE Journal* 12:317-334.
- Van der Hoeven-Hangoor, E., Van der Vossen, J. M. B. M., Schuren, F. H. J. y col.** 2013. Ileal microbiota composition of broilers fed various commercial diet compositions. *Poultry Science* 92(10): 2713-2723.

- Van der Wielen, P. W., D. A. Keuzenkamp, L. J. Lipman, F. van Knapen y S. Biesterveld.** 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microbial Ecology* 44:286-93.
- Van Parys, A., Boyen, F., Dewulf, J., Haesebrouck, F., y Pasmans, F.** 2010. The use of tannins to control *Salmonella typhimurium* infections in pigs. *Zoonoses and Public Health* 57: 423– 428.
- Van Vliet, A.H.M. y Ketley, J. M.** 2001. Pathogenesis of enteric campylobacter infection. *Journal of Applied Microbiology* 90:45S-56S.
- Videnska, P., Rahman, M.M., Faldynova, M., Babak, V., Matulova, M.E., Prukner-Radovic, E., Krizek, I., Smole-Mozina, S., Kovac, J., Szmolka, A., Nagy, B., Sedlar, K., Cejkova, D., Rychlik, I.** 2014. Characterization of egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in croatia, czech republic, hungary and slovenia. *PLOS ONE* 9(10):e110076.
- Vieira, S., Penz, A.M., Pophal, S., y Godoy, J.** 2003. Sodium requirements for the first seven days in broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 12: 362-370.
- Visek, W. J.** 1978a. The mode of growth promotion by antibiotics. *Journal of Animal Science* 46:1447-1469.
- Vissiennon, T., H. Kröger., T. Köhler., y R. Kliche.** 2000. Effect of avilamycin, tylosin and ionophore anticoccidials on *Clostridium perfringens* enterotoxaemia in chickens. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal* 113:9–13.
- Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C., Brenes, A.** 2011. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Science* 90(3):566-78.
- Voidarou, C., E. Bezirtzoglou, A. Alexopoulos, S. Plessas, C. Stefanis, I. Papadopoulos, S. Vavias, E. Stavropoulou, K. Fotoua, A. Tzora, y I. Skoufos.** 2011. Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe* 17:320–324.
- Von Mering, C., P. Hugenholtz, J. Raes, S. G. Tringe, T. Doerks, L. J. Jensen, N. Ward, and P. Bork.** 2007. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* 315:1126-30.
- Walter, J.** 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4985-4996.
- Wallace, R.J., Oleszek, W., Franz, C., Hahn, I., Baser, K.H., Mathe, A. y Teichmann, K.** 2010. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *British Poultry Science* 51: 461–487.
- Walsh, A. M., Sweeney, T., Bahar, B. y col.** 2013. The effects of supplementing varying molecular weights of chitooligosaccharide on performance, selected microbial populations and nutrient digestibility in the weaned pig. *ANIMAL* 7(4): 571-579.

Wang, L., Newman, R.K., Newman, C.W., Hofer, P.J. 1992. Barley beta-glucans alter intestinal viscosity and reduce plasma cholesterol concentrations in chicks. *The Journal of Nutrition* 122(11):2292–7.

Wang, J. X. y K. M. Peng. 2008. Developmental morphology of the small intestine of African ostrich chicks. *Poultry Science* 87:2629–2635.

Wang, J.P., Yoo, J.S., Jang, H.D., Lee, J.H., Cho, J.H., Kim, I.H. 2011a. Effect of dietary fermented garlic by *Weissella koreensis* powder on growth performance, blood characteristics, and immune response of growing pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 89: 2023–2131.

Wang, H.T., Yu, C., Hsieh, Y.H., Chen, S.W., Chen, B.J., Chen, C.Y. 2011b. Effects of albusin B (a bacteriocin) of *Ruminococcus albus* 7 expressed by yeast on growth performance and intestinal absorption of broiler chickens--its potential role as an alternative to feed antibiotics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(13):2338-43.

Wang, Z., Zeng, X., Mo, Y. 2012. Identification and Characterization of a Bile Salt Hydrolase from *Lactobacillus salivarius* for Development of Novel Alternatives to Antibiotic Growth Promoters. *Applied and Environmental Microbiology* 78(24): 8795-8802.

Wang, J.P., Yan, L., Lee, J.H., Kim, I.H. 2013. Evaluation of bacteriophage supplementation on growth performance, blood characteristics, relative organ weight, breast muscle characteristics and excreta microbial shedding in broilers. *Asian-Australasia Journal of Animal Science* 26(4):573-8.

Watson, J.D., Tooze, J., Kurtz, D.T. 1988. *ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética*. Ed. Labor. Barcelona.

Weber, G.M., Michalczuk, M., Huyghebaert, G., Juin, H., Kwakernaak, C., Gracia, M.I. 2012. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials in various locations. *Poultry Science* 91(11):2820-8.

Wei, S., Morrison, M., Yu, Z. 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poultry Science* 92:671–683

Wen, L.F. y He, J.G. 2012. Dose-response effects of an antimicrobial peptide, a cecropin hybrid, on growth performance, nutrient utilisation, bacterial counts in the digesta and intestinal morphology in broilers. *British Journal of Nutrition* 28(10):1756-63.

West, B. y Zhou, B. 1988. Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archaeological Science* 15: 515–33.

Weurding, R.E., H. Enting, M.W.A. Verstegen. 2003a. The relation between starch digestion rate and amino acid level for broiler chickens. *Poultry Science* 82: 279–284.

Weurding, R.E., H. Enting, M.W.A. Verstegen. 2003b. The effect of site of starch digestion on performance of broiler chickens. *Animal Feed Science Technology* 110: 175–184.

- Whitehead, C.C. y T. Keller.** 2003. An update on ascorbic acid in poultry. *World's Poultry Science Journal* 59: 161–184
- Williams, R. B.** 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology* 34:159–180.
- Wilson, I.G.** **Inhibition y facilitation of nucleic acid amplification.** 1997. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741–3751.
- Wunderlich, F., Al-Quraishy, S., Steinbrenner, H. y col.** 2014. Towards identifying novel anti-Eimeria agents: trace elements, vitamins, and plant-based natural products. *Parasitology Research* 113 (10): 3547-3556.
- Williams, B.A., M.W. Verstegen y S. Tamminga.** 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews* 14:207-228.
- Willing, B.P., Russell, S.L., Finlay, B.B.** 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology* 9: 233-243.
- Wise, M.G. y Siragusa, G.R.** 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *Journal of Applied Microbiology* 102(4):1364-5072.
- Wolffs, P., B. Norling, P. Rådström.** 2005. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 60: 315–323.
- Wu, Y. B., V. Ravindran, D. G. Thomas, M. J. Birtles y W. H. Hendriks.** 2004. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *British Poultry Science* 45:76-84.
- Xu, Z. R., Hu, C. H., Xia, M. S., Zhan, X. A., Wang, M. Q.** 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science* 82:1030-1036.
- Yagüe, A.** 2005. Característica de la demanda de pollo en España y otros países. *Jornadas profesionales de avicultura de carne, 25-27 Abril, Valladolid.*
- Yan, L., Meng, Q.W., Ao, X., Zhou, T.X., Yoo, J.S., Kim, H.J., Kim, I.H.,** 2011. Effect of fermented garlic powder supplementation on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs fed low-nutrient density diets. *Livestock Science* 137: 255–259.
- Yan, L., Meng, Q.W., Kim, I.H.** 2012. Effects of fermented garlic powder supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and meat quality in growing-finishing pigs. *Animal Science Journal* 83(5): 411-417
- Yan, L., Meng, Q.W., Kim, I.H.** 2013. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on growth performance, apparent total tract digestibility, blood characteristics and

faecal microbial concentration in weanling pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97(3): 457-464.

Yason, C.V. y Schat, K.A. 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: Clinical signs and virology. *American Journal of Veterinary Research* 48:977.

Yazdi, F.F., Ghalamkari, G., Toghiani, M., Modaresi, M., Landy, N. 2014a. Anise seed (*Pimpinella anisum L.*) as an alternative to antibiotic growth promoters on performance, carcass traits and immune responses in broiler chicks. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(6): 447-451.

Yazdi, F.F., Ghalamkari, G., Toghiani, M., Modaresi, M., Landy, N. 2014b. Efficiency of *Tribulus terrestris L.* as an antibiotic growth promoter substitute on performance and immune responses in broiler chicks. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2): S1014-S1018.

Yegani, M. y Korver, D. R. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science* 87(10): 2052-2063.

Yin Y., Lei F., Zhu L., Li S., Wu Z., Zhang R., Gao GF., Zhu B., y Wang X. 2010. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME Journal* 4:367–376.

Zabala Castro, J.E. 2005. Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. *Universidad Autónoma de Yucatán*. Volumen 7.

Zakeri, A. y Kashefi, P. 2011. The comparative effects of five growth promoters on broiler chickens humoral immunity and performance. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10: 1097–1101.

Zekic, V., Puvaca, N., Beukovic, M., Tica, N., Vukelic, N., Milic, D., Zekic, S. 2014a. Production performance and economic characteristics of broiler chickens fed with extruded rapeseed. *European Journal of Poultry Science* 80.

Zekic, V., Puvaca, N., Milic, D., y col. 2014a. Effect of garlic powder in broiler chicken nutrition: emphasis on production economic efficiency costs and chicken meat quality. *Custos e Agronegocio on line* 10(2): 86-98.

Zhang, L., Xu, J., Lei, L. 2014. Effects of Xylanase Supplementation on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Non-starch Polysaccharide Degradation in Different Sections of the Gastrointestinal Tract of Broilers Fed Wheat-based Diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27 (6): 855-861.

Zhao, X., Guo, Y., Guo, S., Tan, J. 2013. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(14):6477-88.

Zhu, X. Y., T. Zhong, Y. Pandya, y R. D. Joerger. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 68:124–137.

Zhu, H. L., Hu, L. L., Hou, Y. Q. y col. 2014. The effects of enzyme supplementation on performance and digestive parameters of broilers fed corn-soybean diets. *Poultry Science* 93 (7): 1704-1712

Zoetendal, E. G., B. Cheng, S. Koike y R. I. Mackie. 2004. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 5:31-47

Zuidhof, M.J. B. L. Schneider, V. L. Carney, D. R. Korver y F. E. Robinson. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science* 93:1–13

Zulkifli, I., S. R. Hasheimi, M. N. Somchit, Z. Zunita, T. C. Loh, A. F. Soleimani y S. C. Tang. 2012. Effects of *Euphorbia hirta* and virginiamycin supplementation on performance, digestibility, and intestinal microflora population in broiler chickens. *Arch. Geflügelk* 76:6-12.