

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS:

**EFFECTO DE UN ACIDIFICANTE SOBRE LAS COLONIAS DE *Escherichia coli*
Y *Lactobacillus*; Y LA HISTOMORFOMETRÍA INTESTINAL DE POLLOS
MACHOS COBB 500**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD ANIMAL

Presentada por:

Bachiller: JOSÉ ANTONIO TINEO ATOCHE

Asesora:

Dra. GLORIA VÁSQUEZ SÁNCHEZ

Cajamarca – Perú

2022

COPYRIGHT © 2022 por
JOSÉ ANTONIO TINEO ATOCHE
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS APROBADA:

**EFFECTO DE UN ACIDIFICANTE SOBRE LAS COLONIAS DE *Escherichia coli*
Y *Lactobacillus*; Y LA HISTOMORFOMETRÍA INTESTINAL DE POLLOS
MACHOS COBB 500**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD ANIMAL

Presentada por:

Bachiller: JOSÉ ANTONIO TINEO ATOCHE

JURADO EVALUADOR

Dra. Gloria Vásquez Sánchez
Asesora

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares
Jurado Evaluador

Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez
Jurado Evaluador

M.Cs. Fernando Barrantes Mejía
Jurado Evaluador

Cajamarca - Perú

2022



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDUC/D

Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERÚ



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

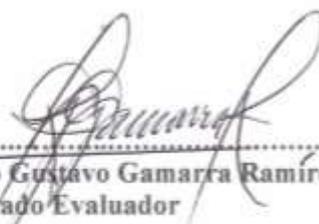
Siendo las *10:00* horas, del día 23 de mayo de dos mil veintidós, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. TEÓFILO SEVERINIO TORREL PAJARES, Dr. RODOLFO GUSTAVO GAMARRA RAMÍREZ, M.Cs. FERNANDO BARRANTES MEJIA**, y en calidad de Asesora la **Dra. GLORIA VÁSQUEZ SÁNCHEZ**, Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada "EFECTO DE UN ACIDIFICANTE SOBRE LAS COLONIAS DE ESCHERICHIA COLI Y LACTOBACILLUS; Y LA HISTOMORFOMETRÍA INTESTINAL DE POLLOS MACHOS COBB 500", presentada por el **Bach. en Medicina Veterinaria, JOSÉ ANTONIO TINEO ATOCHE**.

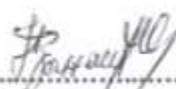
Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó *A.P.P.B.A.R.* con la calificación de *DIECISIETE (Excelente)* la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Bach. en Medicina Veterinaria, JOSÉ ANTONIO TINEO ATOCHE**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, con Mención en Salud Animal.

Siendo las *11:15* horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Dra. Gloria Vásquez Sánchez
Asesora


.....
Dr. Teófilo Severino Torrel Pajarez
Jurado Evaluador


.....
Dr. Rodolfo Gustavo Gamarra Ramírez
Jurado Evaluador


.....
M.Cs. Fernando Barrantes Mejía
Jurado Evaluador

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a los conocimientos impartidos en esta casa de estudios y la disponibilidad de mi asesora Dra. Gloria Vásquez Sánchez.

También quiero agradecer al Mayor PNP Biólogo Héctor Mejía Paico por su asesoría en los cultivos microbiológicos, al Tecnólogo Médico José Chancafe por su apoyo en el procesamiento de las láminas histológicas para histomorfometría intestinal y a mi colega M.V. Celso Santiago Albújar Sayaverde, quién es jefe de Laboratorio Clínico A&C, por su ayuda incondicional.

En el plano personal, no puedo olvidarme de todas aquellas personas que me han acompañado hasta la conclusión de esta tesis, principalmente a mis padres y a toda mi familia, por su apoyo en todos los sentidos posibles; también a mis compañeros de carrera por su gentil apoyo y mis amigos de vida, quienes pueden ver conmigo un sueño realizado.

CONTENIDO

Ítem	Páginas
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	vi
Lista de tablas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Prefacio.....	x
Lista de abreviaciones.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de Estudio.....	4
2.1.1. Antecedentes internacionales.....	4
2.1.2. Antecedentes nacionales.....	8
2.2. Bases teóricas.....	10
2.2.1. Microbiota intestinal.....	10
2.2.2. Ácidos orgánicos - acidificantes.....	11
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus</i>	12
2.2.4. Histomorfometría intestinal.....	13
CAPÍTULO III DISEÑO Y CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	18
3.1. Hipótesis.....	18
3.2. Diseño de Investigación.....	18
3.3. Localización.....	22
3.4. Materiales.....	23
3.4.1. Material Biológico.....	23

3.4.2. Galpón y equipos de crianza	23
3.4.3. Equipos y materiales de laboratorio	24
3.4.4. Alimentación.....	25
3.5. Análisis bacteriológico en laboratorio	26
3.5.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	26
3.5.2. Cultivo de <i>Lactobacillus</i>	29
3.6. Análisis de la histomorfometría intestinal	31
3.6.1. Obtención de láminas histológicas.....	31
3.6.2. Histomorfometría de las vellosidades intestinales.....	32
3.7. Procedimiento estadístico	33
CAPÍTULO IV RESULTADO Y DISCUSIÓN	34
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
5.1. Conclusiones.....	46
5.2. Recomendaciones	47
5.3. Lista de referencias	48
Apéndice.....	54
Apéndice 1: Guías de observación de las Unidades formadoras de colonias	55
Apéndice 2: Fichas de registro de la histomorfometría intestinal	67
Apéndice 3: Evidencias sobre el experimento	70
Apéndice 4: Histomorfometría intestinal a los 21 y 35 días	74
Anexos.....	76
Anexo 1: Caldo MRS.....	77
Anexo 2: Agar MRS	78
Anexo 3: Caldo Mac Conkey.....	82
Anexo 4: Agar Mac Conkey	85

LISTA DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Grupos muestrales de los pollos organizados según los niveles de inclusión del acidificante comercial por repetición.....	18
Tabla 2. Grupos muestrales de los pollos organizados por tratamiento y por el número de repeticiones a los 21 días de edad.....	19
Tabla 3. Grupos muestrales de los pollos organizados por tratamiento, por el número de repeticiones a los 35 días de edad.....	19
Tabla 4. Raciones de inicio para pollos según el nivel de acidificante.....	25
Tabla 5. Raciones de crecimiento para pollos según el nivel de acidificante	26
Tabla 6. Efecto del acidificante comercial sobre las UFC de <i>E.coli</i> en pollos de 21 y 35 días de edad.....	34
Tabla 7. Efecto del acidificante comercial sobre las UFC de <i>Lactobacillus</i> en pollos de 21 y 35 días de edad.....	37
Tabla 8. Efecto del acidificante comercial sobre la altura de la vellosidad intestinal en pollos de 21 y 35 días de edad.....	39
Tabla 9. Efecto del acidificante comercial sobre el ancho de la vellosidad intestinal en pollos de 21 y 35 días de edad.....	40
Tabla 10. Efecto del acidificante comercial sobre la altura de cripta de la vellosidad intestinal en pollos de 21 y 35 días de edad.....	41
Tabla 11. Efecto del acidificante comercial sobre el número de vellosidades intestinales por milímetro en pollos de 21 y 35 días de edad.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.	Funciones de la microbiota intestinal.....10
Figura 2.	Altura de la vellosidad.....14
Figura 3.	Ancho de la vellosidad.....15
Figura 4.	Altura de cripta.....16
Figura 5.	Número de vellosidades.....17
Figura 6.	Obtención de muestras para recuento de unidades formadoras de colonias.....21
Figura 7.	Obtención de muestras para histomorfometría.....21
Figura 8.	Fundo San Pedro – Chiclayo.....22
Figura 9.	Diluciones seriadas 10^{-5}27
Figura 10.	Técnica de siembra por estría en placa.....28
Figura 11.	Láminas procesadas de duodeno.....32

PREFACIO

Siendo la carne de pollo la más consumida en nuestro país, es de vital importancia para la Salud Animal y Salud Pública el reemplazo de los Antibióticos Promotores de Crecimiento de la dieta de las aves; por esto el mayor aporte de la investigación radica en saber si el acidificante comercial ejerce la misma acción bactericida que el Antibiótico.

Esta investigación fue motivada para poner en práctica los conocimientos obtenidos sobre aditivos alimentarios como los acidificantes comerciales; y el mejor proceso de lograrlo fue con un trabajo de tipo aplicativo y experimental con la finalidad de evaluar sus efectos en los pollos Cobb 500. El alcance de la presente investigación fue explicativa, este nivel verificó la hipótesis, que nos permitió decidir que el acidificante, es una buena alternativa al uso de Antibióticos Promotores de Crecimiento.

Cabe resaltar que la investigación se ha realizado con el mayor cuidado posible, con criterio profesional cumpliendo las exigencias de la investigación científica y el bienestar animal.

LISTA DE ABREVIACIONES

A ⁻ :	Base conjugada del ácido.
BLEE:	Betalactamasas de espectro extendido.
DCA:	Diseño completamente aleatorizado.
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i> .
H:	Ión Hidrógeno o protón.
K _a :	Constante de disociación ácida.
MRS:	Man, Rogosa y Sharpe.
p:	Nivel de significancia.
pH:	Potencial Hidrógeno.
pK _a :	Logaritmo negativo de K _a .
TG1:	Tracto gastrointestinal.
UFC:	Unidades formadoras de colonias.

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo determinar los efectos de un acidificante comercial (ácido propiónico, ácido fórmico, ácido ortofosfórico, propionato de calcio, mezcla de aromatizantes y ácido silícico precipitado y secado) utilizado como aditivo en la dieta de pollos machos Cobb 500, sobre las Unidades Formadoras de Colonias de *Escherichia coli* y de *Lactobacillus* y en histomorfometría intestinal. La muestra estuvo integrada por 63 pollos machos Cobb 500, fueron repartidos en tres tratamientos, el primero formado por el grupo control, el segundo y tercero recibieron el acidificante comercial al 0.1% y 0.2% respectivamente; estos grupos fueron evaluados durante 21 y 35 días. Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) mediante análisis de promedios y desviación estándar, los que permitieron contrastar las hipótesis mediante la prueba “t” de student, para establecer diferencias entre los tratamientos. La investigación concluyó, que los tratamientos en cuanto al tiempo de aplicación y a la concentración presentaron efectos positivos en el aumento de UFC/ml de *Lactobacillus* y la disminución de UFC/ml de *E. coli*. Las UFC de *E. coli* en los grupos que recibieron 0.1% y 0.2% fueron más bajas frente al grupo control a los 21 y 35 días $p < 0.01$. Las UFC de *Lactobacillus* fueron más altas en los grupos que recibieron el acidificante al 0.1% y 0.2% frente al grupo control a los 21 y 35 días de tratamiento $p < 0.01$, obteniéndose mejor resultado en el grupo de 0.1% durante 35 días. En las medidas histomorfométricas, para la altura de vellosidad, ancho de vellosidad, altura de la cripta no hay diferencias significativas en los tiempos de tratamiento ni en las dosis de aplicación.

Palabras claves: *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, histomorfometría intestinal

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the effects of a commercial acidifier (propionic acid, formic acid, orthophosphoric acid, calcium propionate, a mixture of flavorings and precipitated and dried silicic acid) used as an additive in the diet of male Cobb 500 broilers, on *Escherichia coli* and *Lactobacillus* colony forming units and intestinal histomorphometry. The sample consisted of 63 Cobb 500 chickens, which were divided into three treatments, the first one formed by the control group, the second by the application of 0.1% dose of the commercial acidifier, the third by the application of 0.2% dose of the commercial acidifier, within each one, they were separated into two groups according to the time of application, 21 and 35 days, respectively. For the statistical analysis, the Completely Randomized Design (CRD) was used by means of an ANOVA analysis of variance to establish differences between treatments. The research concluded that the treatments in terms of application time and dose size presented positive effects on the formation of bacterial colonies, increase in *Lactobacillus*, there is a difference between applying it for 21 days and for 35 days ($p < 0.01$) and there are results with only 0.1% of commercial acidifier. With respect to the decrease in *Escherichia coli*, there is no difference between applying it for 21 days and for 35 days, and with respect to the dose, there are better results with the application of 0.1% of commercial acidifier ($p < 0.01$). In the histomorphometric measurements, for villus height, villus width and crypt height, there are no significant differences in the application times or doses.

Key words: *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, intestinal histomorphometry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las dietas avícolas están compuestas por muchos componentes, como cereales, subproductos de cereales, lípidos (aceites), proteínas vegetales, vitaminas y minerales añadidos, así también como aminoácidos y aditivos alimentarios. Un problema nutricional importante en los países en desarrollo es la contaminación biológica y química en el alimento de las aves, que puede tener serias implicaciones para el crecimiento de estas y la seguridad de los productos avícolas. Por otro lado, mejorar la tasa de conversión alimenticia es un factor muy importante en la producción avícola (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura, 2021).

Es una práctica común en la industria avícola, agregar antimicrobianos a las dietas y al agua potable para mejorar la utilización del alimento, pero no está exento de riesgos, ya que la exposición prolongada puede generar resistencia a los patógenos. La tendencia mundial es obtener productos cárnicos seguros, aptos para el consumo humano, inocuos, que respeten los indicadores de bienestar animal y representen la sostenibilidad. (Cervantes, 2021). Además, la aplicación de reductores de ácido en el agua potable es un medio para reducir los antibióticos (Aidara-Kane, 2015). Los ácidos orgánicos también tienen una actividad prolongada en el intestino, lo que ayuda a los animales a reducir la carga de patógenos en el intestino; por otro lado, ayuda a estabilizar la microbiota gastrointestinal y mejorar la inmunidad (Real Escuela de Avicultura, 2017).

La acidificación facilita la digestión de proteínas antes de que pasen al intestino delgado, en donde fueron finalmente reducidos a aminoácidos. Incrementa la proliferación

de lactobacilos a expensas de la microbiota (Enterobacterias). Mejora la morfología de la mucosa intestinal por la producción de menos bacterias patógenas, favorece el crecimiento de lactobacilos endógenos y limita el crecimiento de *E. coli* mejorando la salud del sistema digestivo, favoreciendo la absorción de nutrientes. Hoy en día se abusa indiscriminadamente de los antibióticos como preventivo de enfermedades, creando resistencias por subdosificación del medicamento y obteniéndose carcasas con residuos de antibióticos, afectando la salud humana (Gauthier *et al.*, 2011).

Uno de los muchos desafíos que enfrenta la industria avícola en el Perú es la eficiencia para producir alimentos sin problemas, las personas utilizan acidificantes para interferir en la dieta y conservarlos ya que son atacados por hongos, bacterias, microorganismos patógenos como *E. coli*, entre otros. También reducir el pH del tubo digestivo, evita la proliferación de microorganismos patógenos que afectan a la salud animal y evita alteraciones en la microbiota intestinal (Amaguaña, 2012).

La salud intestinal de las aves tiene muchas implicaciones para la salud, el bienestar, la eficiencia de la producción, la seguridad alimentaria y el impacto ambiental, y este tema se ha vuelto cada vez más importante en las últimas dos décadas. La salud intestinal es fundamental para mantener una fisiología gastrointestinal, digestión, absorción, metabolismo, inmunidad y función endocrina eficiente y sostenible (Ovidio-Rondón, 2019). La disbacteriosis intestinal de los pollos ocasiona pérdidas económicas muy severas que van desde las diarreas hasta la contaminación de la carcasa y por ende decomisos en camales. Surge una solución considerando la capacidad del pH de controlar las poblaciones de *E. coli* y aumentar la proliferación de los *Lactobacillus*.

En cuanto a los problemas observados en la región Lambayeque, está el tema del riesgo de la Salud Pública y Animal, ya que, si los animales no tienen una buena alimentación y control nutricional, esto repercute en las personas llegando a causar enfermedades; un problema en su alimentación es la *E. coli*, una bacteria que causa mortalidad severa en los pollos, por ello se da el uso indiscriminado de antibióticos, causando resistencia para curar enfermedades; para evitar el gasto de una buena nutrición se usan fármacos, en consecuencia, la necesidad de realizar investigación en este campo es evidente; ante esta situación se planteó la presente investigación que tuvo como objetivo: determinar los efectos de utilización de un acidificante comercial, como aditivo en la dieta de pollos machos Cobb 500, en las de Unidades Formadoras de Colonias de *Escherichia coli* y *Lactobacillus* y en la histomorfometría intestinal de pollos machos Cobb 500 de 21 y 35 días de edad.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de Estudio

2.1.1. Antecedentes internacionales

En el presente estudio se determinó el efecto del suministro de *Lactobacillus* en los parámetros productivos y salud intestinal de 240 pollos, en 4 tratamientos; sin antibióticos ni anticoccidiales (T₀), con probiótico comercial T₁, T₂ y T₃, además de agregar el de *Lactobacillus casei* microencapsulado y sin microencapsular. El suministro de *Lactobacillus* se evaluó utilizando parámetros bioquímicos de rendimiento, morfología intestinal y respuesta inmune. Se obtuvo como resultado que la viabilidad presenta 75.9% para el microencapsulado y la eficiencia de 89,4%. En bioquímica sanguínea, solo se observaron elevaciones de colesterol y la administración oral de microcápsulas de *Lactobacillus casei* mejoró las respuestas inmunitarias. En cuanto a la morfología intestinal, la histopatología se identificó como hiperplasia de células caliciformes con inmunidad humoral mejorada en el intestino delgado y se concluyó que el uso de microencapsulación de *Lactobacillus casei* mejoró el rendimiento y los parámetros inmunológicos, así como la salud intestinal en pollos de engorde (Jurado-Gámez y Zambrano- Mora, 2020).

Así mismo, otro estudio tuvo la finalidad de evaluar el efecto que tiene el suplemento con ajo (*Allium sativum*) en los parámetros productivos y en la población de agentes patógenos intestinales en pollos, se utilizaron 80 pollos,

distribuidos en 4 tratamientos; se contó con un tratamiento control (TC) utilizando alimento balanceado, el tratamiento uno (T₁) se suplementó con *Allium sativum* 50g., T₂ 100g. y T₃ 150 g. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre la tasa de conversión alimenticia y la ganancia de peso, pero hubo una diferencia significativa en el número de unidades formadoras de colonias para *Salmonella* y *Escherichia coli*, menos números en las semanas 2 y 4, se requiere menos dilución para la replantación, bacterias beneficiosas en la producción intestinal ha mejorado (Álvarez y Gómez, 2020).

En la siguiente investigación evaluó el uso del probiótico *Bacillus subtilis* en dietas para pollos reduciendo la carga bacteriana dañina en el tracto gastrointestinal con un total de 200 pollitos; se encontró que el aislamiento de organismos *E. coli* enteropatógenos fue positivo en ambos tratamientos desde el día 1 hasta el día 42 de vida del pollo, con éxito en el tracto gastrointestinal del pollo y debido a la presencia del intestino grueso previamente presente en esta área, la presencia de la bacteria *Bacillus*, que afectó negativamente los resultados e impidió la colonización exitosa de la microbiota intestinal por parte de los probióticos; concluyó que no hubo diferencia significativa entre el grupo control y el grupo provisto de probióticos (Quiroa, 2019).

Este estudio de referencia se diseñó para evaluar los efectos de diferentes dosis de *Lactobacillus acidophilus* en el agua de bebida sobre los parámetros de producción y las características morfológicas de los pollos y se aplicó a 264 pollos, según su análisis, la introducción de la bacteria tuvo un efecto positivo en el aumento de la microbiota intestinal de las aves, ya que en la primera fase, la dosis de 3ml, la microbiota aumentó un 64,4% mientras que en el segundo período en

comparación con el grupo control, el ciclo a la misma dosis fue del 73,8%. Además, se ha demostrado que la adición de probióticos mejora el sistema inmunitario de las aves, y se ha determinado que con una dosis inicial de 2,5 ml se consigue un elevado ratio de al menos un 0,24 % en peso, mientras que, en la segunda etapa, la relación fue de 0,19%, ya que cuando no hay amenaza del estado patológico, el órgano deja de producir linfocitos B, por lo que reduce su peso (Simbaña, 2019).

Otro estudio se planteó el objetivo de evaluar el efecto de acidificantes en los indicadores productivos, económicos y en la presencia de *Escherichia coli*. Incluyeron 160 aves de la línea Ross en cuatro tratamientos: T₁ control sin acidificantes, T₂ empleando Gustor XXI, T₃ (Mycocurd dry) y T₄(Mycokap). Se reflejaron diferencias significativas entre tratamientos de la variable de estudio, siendo el segundo y tercer valor los mejores. Se concluyó que el uso de acidificantes mejoró los parámetros de producción y redujo la presencia de bacterias patógenas como *E. coli*, también se ha demostrado que estos compuestos reducen el pH del intestino al aumentar las bacterias beneficiosas y reducir las bacterias patógenas (Arana *et al.*, 2017).

Se evaluó la eficacia de *Lactobacillus plantarum B1* en la prevención de la infección gastrointestinal por *E. coli*. El *L. B1* mostró resistencia al ácido y la bilis e inhibió el crecimiento de *E. coli*. Además, *L. B1* exhibió alta capacidad para adherirse al epitelio. Los 240 pollos fueron asignados a 4 grupos de tratamiento: de control negativo (NC) con dieta basal y sin ser desafiados; de control positivo (PC) con dieta basal y desafiados con *E. coli*; *L. plantarum (LP)* tratados con dieta basal con 2×10^9 UFC/kg de *L. B1* y se expusieron a *E. coli*; y al tratamiento con antibióticos alimentados con una dieta basal con sulfato de colistina (20 mg/kg) y desafiados con *E. coli*. Los pollos alimentados con *Lactobacillus plantarum B1*

tuvieron mayor peso vivo que los de PC. La dieta *L. B1* disminuyó *E. coli* en el contenido cecal y ha aumentado bacterias de ácido láctico. La suplementación aumentó la concentración secretora de IgA en la mucosa ileal y redujo los niveles de necrosis tumoral. Estos resultados sugieren que el *L. B1* promueve el crecimiento, disminuye los recuentos de *E. coli* y aumenta la población de *Lactobacillus*, mejorando la inmunidad de la mucosa intestinal desafiada con *E. coli* (Wang *et al.*, 2017).

Se evaluaron 200 pollos machos de la línea Avian Cobb 48, utilizaron 0.5 ml/litro de líquido consumido de un bien comercial a base de *Lactobacillus*. En la necropsia, se extirparon 2 cm de intestino delgado del duodeno, yeyuno e íleon y se examinaron histológicamente. Los cambios morfológicos se evaluaron contando el número de vellosidades intestinales por campo de visión y se midió la longitud y el ancho de las vellosidades. Mejores resultados con bacterias del ácido láctico. Estos microbios introducidos a través del agua potable tienen un efecto directo en las criptas de Lieberkühn, promoviendo el crecimiento mitótico de los enterocitos y aumentando la longitud y el ancho de las vellosidades, aumentando así la nutrición de proteínas, lípidos y carbohidratos. El intestino delgado puede aumentar su superficie de absorción, no solo en longitud, sino también en el número de vellosidades (Rodríguez y Moreno, 2016).

Este trabajo fue revisado con el objetivo de evaluar el efecto de los probióticos en los indicadores de rendimiento y la morfología de las vellosidades intestinales en pollos de engorde. Los tratamientos A (cultivos manuales) y B (probióticos comerciales DP) mostraron mayores tasas de producción que otros controles; ganancia de peso final (2271.83 g vs 2201.67 g), gasto de alimento

(5140g vs 5005 g) y conversión alimenticia (2.32 vs 2.35); Se encontró que el tratamiento A era el mejor (357,5 frente a 351), informó la mejor medida de ancho de vellosidades de 164,72 μm , con una altura de vellosidades de 1879,28 μm y una profundidad de cripta más baja con 265,72 m, lo que crea más espacio para que los nutrientes se absorban en el intestino (González *et al.*, 2016).

2.1.2. Antecedentes nacionales

En Perú, el propósito de este estudio fue determinar el porcentaje de susceptibilidad o resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de pollos de engorde asintomáticos a 18 antibióticos de uso común en la producción avícola, que a su vez producen β -lactamasas (BLEE). Se aislaron cuarenta y seis cepas de *E. coli* de bolsas Fabricius de 100 pollos de 2 a 6 semanas de edad (20 de granjas avícolas y 80 de mataderos). Como resultado, concluyeron que el 91 % de las cepas eran resistentes a la ampicilina y el 80 % eran resistentes a las cefalosporinas; además, se encontró que el 30 % era resistente. Se han demostrado cepas de *E. coli* con alta resistencia a los antibióticos, incluida la expresión de BLEES, en pollos de engorde asintomáticos (Carvajal *et al.*, 2019).

En otro estudio, el objetivo fue evaluar el uso de aldehydos simbióticos y canela para mejorar la ganancia de peso vivo en pollos de engorde Cobb 500; para evaluar el uso de diferentes tratamientos en el contexto del uso de simbióticos, se utilizaron 240 pollos de engorde Cobb 500 en el estudio. Distribución durante la iniciación, crecimiento y madurez. Según un diseño completamente aleatorizado (DCA). Para el trabajo experimental se consideraron los siguientes tratamientos: T₀: dieta control, T₁: dieta cinamaldehído, T₂: simbiosis agua potable

desde el inicio hasta el final del experimento. Al final de los 7 ciclos, el consumo de alimento (g/cabeza/periodo) de T₀ y T₁ fue de 4643 g, 4838 g y 4979 g, respectivamente. Los pesos finales (g/cabeza/etapa) de T₀, T₁ y T₂ fueron 2501,75 g, 2852,16 g y 3030, 2g respectivamente, se encontró diferencia significativa y las dietas utilizadas permitieron un mejor crecimiento y por ende aumentaron los beneficios económicos, excepto la conversión alimenticia (Oliva, 2019).

Finalmente, un análisis de este trabajo, que sugirió formular probióticos a partir del fluido intestinal de un lote de pollos para evaluar los parámetros de rendimiento en comparación con otro lote de pollos sin probióticos, dividió una muestra de 200 pollos en aquellos que usaban probióticos y 2 grupos de tratamiento sin probióticos o con adición de probióticos. De los resultados de determinar el peso medio del tratamiento de comparación fue 1.688 kg y el tratamiento 1 fue 1.864 kg; la tasa de mortalidad en el tratamiento control fue del 3% y en el tratamiento 1 fue del 0%; La conversión final para el tratamiento de control fue 2,30 y para el tratamiento 1 fue 1,87. El índice de eficiencia del tratamiento testigo fue de 79,08% y el del tratamiento 1 fue de 99,66%. Se concluyó que, debido a la acción de los probióticos, se mejoró la actividad digestiva y el índice de eficiencia de los animales en comparación con los animales criados de manera convencional, lo que resultó en un mejor peso vivo, una menor mortalidad y una mejor tasa de conversión alimenticia (Herrera, 2017).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Microbiota intestinal

Las aves tienen una diversidad de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, cuya función es la exclusión competitiva es decir evitan la adhesión al epitelio de la mucosa intestinal de otras bacterias como *E.coli*. Los pollos recién nacidos tienen *Lactobacillus* provenientes de la madre durante la formación del huevo, de la incubadora, del alimento y medio ambiente de la granja, etc. Estas bacterias cumplen diversas funciones (figura 1), entre las más conocidas tenemos: exclusión competitiva, digestión de nutrientes, función inmunológica, entre otras (Olvera, 2022).

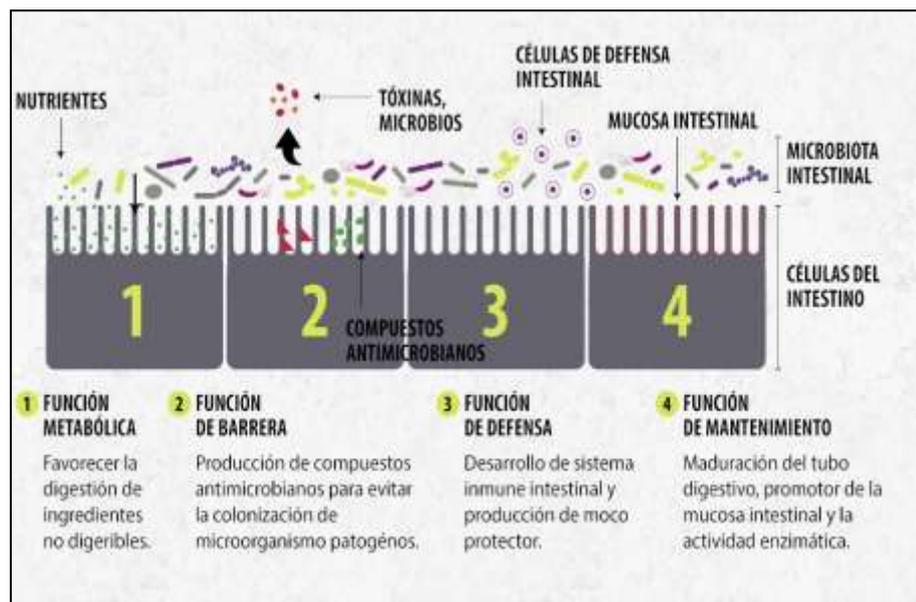


Figura 1. Funciones de la microbiota intestinal (Olvera, 2022).

2.2.2. Ácidos orgánicos – acidificantes

En cuanto a los acidificantes, ácidos orgánicos, éstos se distinguen por el grupo funcional COOH al que se puede unir un grupo orgánico o un átomo de hidrógeno (Acosta, 2020). Los nombres comunes utilizados para describir este grupo de compuestos orgánicos incluyen ácidos grasos volátiles, lipófilos, débiles o carboxílicos. Los ácidos orgánicos saturados distinguen los ácidos cítrico, fórmico, acético, málico, tartárico, salicílico y oxálico. La disociación de ácidos débiles depende del pH y aumenta a medida que se acerca a la neutralidad. La proporción de ácido no disociado presente en cualquier pH el valor se puede calcular a partir de la fórmula $[H^+] / ([H^+] + K_a)$. El ácido fórmico (pK_a , 3.7) es, por lo tanto, un ácido más fuerte que el ácido propiónico (pK_a 4.85), los valores de pH tendrán una proporción menor de ácido en la forma no disociada (Cherrington *et al.*, 1991).

Dado que las moléculas de ácido son liposolubles, se asume que estas se propagan abiertamente por medio de la pared celular, ejerciendo así su capacidad antimicrobiana. Estos ácidos inhiben la acción de las enzimas necesarias para la supervivencia de las bacterias patógenas. Por otro lado, la crianza de pollos se ve afectada por la aparición y el ataque de microorganismos patógenos como la *Escherichia coli*, que amenazan salud del animal y ponen en riesgo la humana que es máximo consumidor, por lo que el uso de acidificantes para combatir esta bacteria es cada vez mayor, debido entre otros aspectos a la tendencia de la prohibición de los antibióticos (Arana *et al.*, 2017).

2.2.3. *Escherichia coli* y *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* inhiben la colonización de patógenos porque forman una barrera defensiva ocupando espacio suficiente del epitelio intestinal disponible como para que las bacterias patógenas se adhieran (Herrera, 2018). Los *Lactobacillus* presentan sitios de unión (carbohidratos) parecidos a las adhesinas de la superficie celular que se encuentran en las bacterias patógenas potenciales como lo son *E. coli*, *Clostridium*, *Salmonella*. También producen bacteriocinas que ejercen una actividad antimicrobiana. Otro hallazgo importante de este género microbiano es la producción de sustancias como ácido láctico, ácido acético, y ácido propiónico que acidifican el intestino y así los patógenos no pueden proliferar ejerciendo una exclusión competitiva (Blajman *et al.*, 2015).

Escherichia coli es una bacteria común en los intestinos de los humanos y otros animales de sangre caliente. Si bien la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar enfermedades graves transmitidas por los alimentos. Las infecciones por *E. coli* generalmente se transmiten al comer alimentos o agua contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda (Organización Mundial de la Salud, 2021). Respecto al concepto de *Lactobacillus*, son bacterias nacidas de lácteos fermentados, por lo que estas bacterias reducirían las toxinas producidas por las bacterias intestinales, promoviendo la salud y prolongando la vida (Oliveira y González-Molero, 2016).

El uso de acidificantes en pollos permite brindar carnes inocuas para el hombre, preservan el alimento, reducen la carga bacteriana y el pH gastrointestinal impidiendo síndromes de tránsito rápido, diarreas, enfermedades como colisepticemias, salmonelosis que provocan pérdidas en la producción

(Amaguaña, 2012). El intestino delgado de un pollito recién nacido es inmaduro y su desarrollo requiere cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. A medida que el animal crece, crea una comunidad microbiana más compleja que desarrolla firmas microbianas específicas. El tracto gastrointestinal (TGI) tiene distintas bacterias, hongos y protozoos, siendo las bacterias los microorganismos más predominantes, presentando una concentración en el íleon de 10^8 UFC/g y en ciegos de 10^{10} UFC /g. (Blajman *et al.*, 2015).

Los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren durante las primeras 2 semanas de vida inducen a un cultivo intensivo, lo que resulta en un alto grado de degradación de la microbiota natural, lo que conduce a una susceptibilidad a la colonización del intestino por patógenos, incluidos en particular *Escherichia coli* y *Salmonella.*, que desencadenan una respuesta inflamatoria, inducen una infección local o sistémica, o sintetizan toxinas u otros compuestos patógenos nocivos. Teniendo en cuenta las importantes pérdidas económicas que causan estos patógenos en las granjas avícolas, es evidente que existe la preocupación de que la manipulación de la microbiota intestinal se pueda utilizar como estrategia para prevenir la invasión de patógenos entéricos y mejorar la salud y el rendimiento de las aves (Blajman *et al.*, 2015).

2.2.4. Histomorfometría intestinal

El duodeno de las aves, igualmente que el resto del tracto digestivo, muestra una distribución histológica pareja a la de los mamíferos, siendo un tubo multicapa con: túnica mucosa, túnica submucosa, túnica muscular y túnica serosa. La superficie luminal del duodeno presenta una estructura cuyo objetivo es aumentar la superficie de absorción (Barrett *et al.*, 2010). Así, se presentan

microvellosidades, vellosidades, y pliegues de la mucosa y submucosa, según la especie. Se observan vellosidades de diversa longitud según el segmento, disminuyendo progresivamente (Herrera, 2018). Durante los primeros días de vida ocurre una disminución en el número de vellosidades, para luego permanecer constante. En el intestino delgado de los pollos podemos realizar mediciones importantes entre las cuales destacan: altura de vellosidad, ancho de vellosidad, altura de cripta y número de vellosidades por milímetro (Pelicano *et al.*, 2003).

2.2.4.1 . Altura de vellosidad

La altura de las vellosidades se determinó midiendo la distancia entre el ápice y la base de la vellosidad (figura 2).

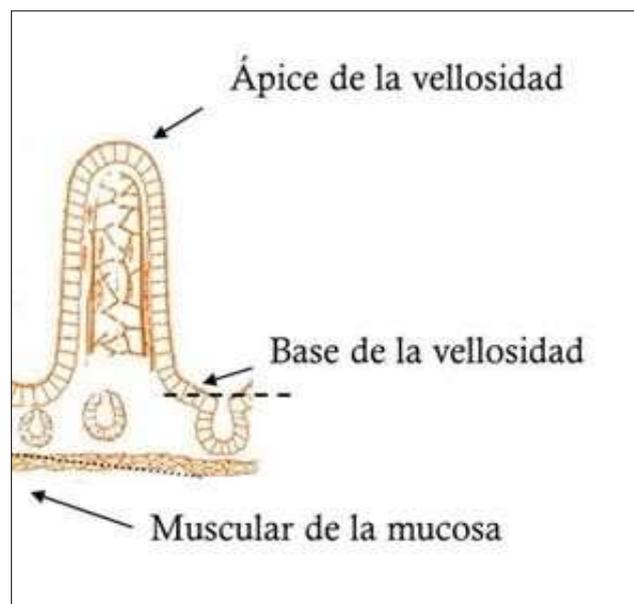


Figura 2: Altura de la vellosidad. Fuente: Elaborado por Checcnes (2014).

2.2.4.2. Ancho de vellosidad:

El ancho de la vellosidad se determinó midiendo en la parte central de la misma (figura 3).

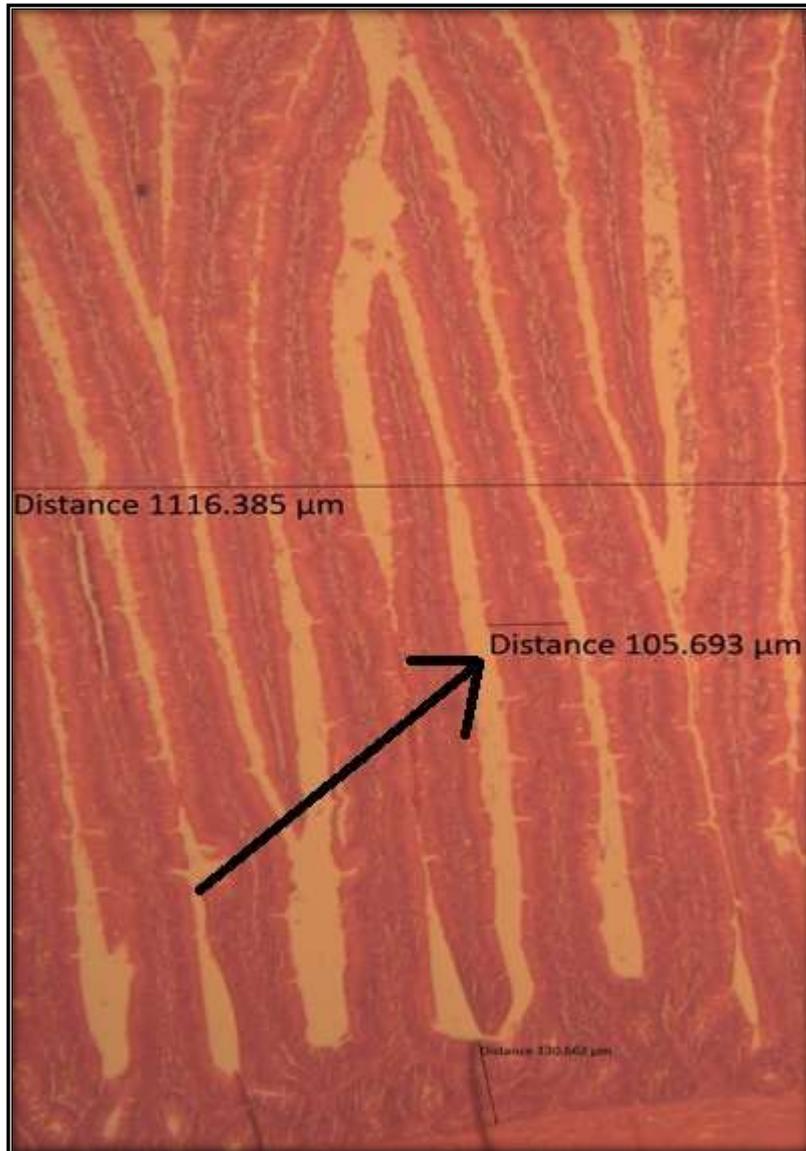


Figura 3: Ancho de la vellosidad. Fuente: Elaboración propia.

2.2.4.3 . Altura de la cripta

La longitud de la cripta se encontró calculando el recorrido entre la base de la cripta hasta la boca de la cripta (figura 4).

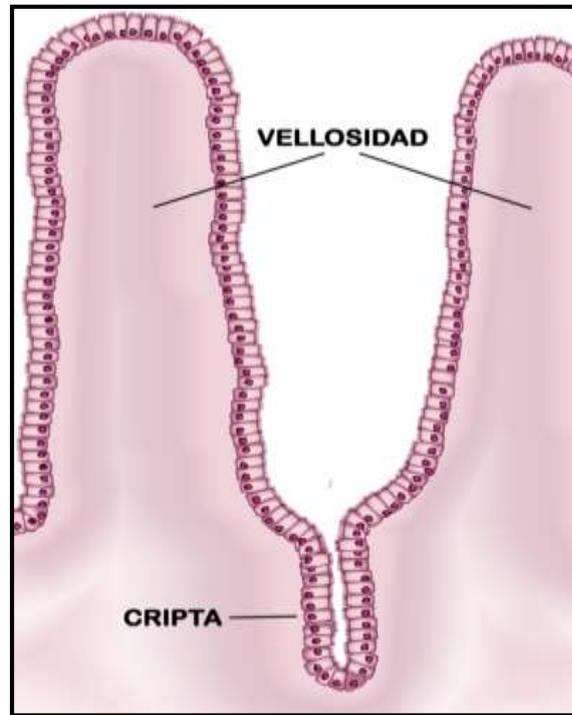


Figura 4: Altura de la cripta. Fuente: Elaborado por Ballena (2015).

2.2.4.4 . Número de vellosidades

Para el recuento de vellosidades intestinales y criptas de Lieberkühn, se seleccionaron al azar 5 puntos por sección, se midió una longitud de 1 mm paralela a la base de las vellosidades y se contó el número de vellosidades en esa zona (figura 5).

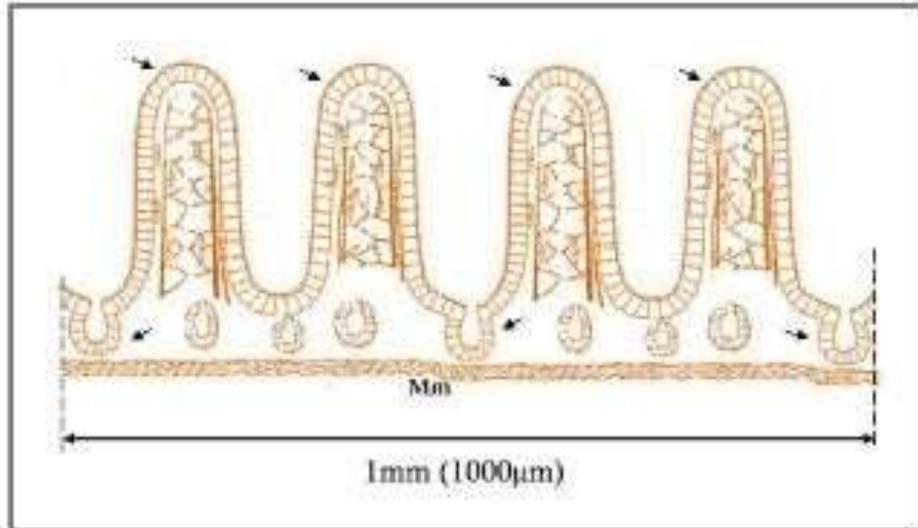


Figura 5: Número de vellosidades. Fuente: Elaborado por Checcnes (2014).

CAPÍTULO III

DISEÑO Y CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis

El acidificante comercial como aditivo en la dieta de pollos machos Cobb 500 tiene efecto reductor de las Unidades Formadoras de Colonias de *Escherichia coli* y aumenta el número de Unidades Formadoras de Colonias de *Lactobacillus* y mejora la histomorfometría intestinal.

3.2. Diseño de la investigación

La investigación se realizó en 63 aves, las que fueron distribuidas en 3 grupos, el T₁ que se consideró como testigo, el T₂ y T₃ que recibieron el acidificante al 0.1% y 0.2% respectivamente; cada grupo tuvo 7 aves en 3 repeticiones (tabla 1).

Tabla 1. Grupos muestrales de los pollos organizados según los niveles de inclusión del acidificante comercial por repetición.

Tratamientos	Repeticiones			
	R ₁	R ₂	R ₃	
Testigo T1 - 0%	7	7	7	21
T2 - 0.1%	7	7	7	21
T3 - 0.2%	7	7	7	21
TOTAL				63

Los efectos del acidificante fueron estudiados cuando las aves lo recibían en el alimento durante 21 y 35 días de vida, en 32 y 31 pollos respectivamente; aves que recibieron en la fase de inicio y crecimiento en la crianza (tabla 2 y tabla 3).

Tabla 2. Grupos muestrales de los pollos organizados por tratamiento y por el número de repeticiones a los 21 días de edad.

Tratamientos	Repeticiones			
	R ₁	R ₂	R ₃	
Testigo T1 - 0%	3	4	4	11
T2 - 0.1%	3	3	4	10
T3 - 0.2%	3	4	4	11
TOTAL				32

Tabla 3. Grupos muestrales de los pollos organizados por tratamiento y por el número de repeticiones a los 35 días de edad.

Tratamientos	Repeticiones			
	R ₁	R ₂	R ₃	
Testigo T1 - 0%	4	3	3	10
T2 - 0.1%	4	4	3	11
T3 - 0.2%	4	3	3	10
TOTAL				31

Terminada cada fase de crianza se faenó a los pollos siguiendo las directrices para el sacrificio de los animales de la OIE, dentro del código sanitario de animales terrestres. En la faena se procedió al retiro del tubo digestivo

obteniéndose 2 cm de la porción intestinal media del duodeno debidamente ligada en ambos extremos, la que fue depositada en envases estériles etiquetados con la información respectiva (figura 6), para su conservación de la muestra y traslado inmediato para realizar los cultivos de la *Escherichia coli* en caldo y agar Mac Conkey y de los *Lactobacillus* en caldo y agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (apéndice 7 y 10) en el laboratorio de Microbiología del Hospital Sanidad de Chiclayo.

Asimismo se cortó 2 cm de la porción media del duodeno y se puso inmediatamente en envases de boca ancha que contenían formol tamponado al 10% en proporción de 9 : 1, los que fueron tapados y etiquetados con la información respectiva de las aves (figura 7) y trasladados al Laboratorio de Patología del Hospital Regional de Lambayeque para el procesamiento de láminas histológicas coloreadas con Hematoxilina y Eosina (H-E) para luego realizar los estudios morfométricos de las vellosidades intestinales en el Laboratorio de Fisiología y Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo (UNPRG) de Lambayeque.

El diseño de la investigación fue de tipo experimental con 2 grupos de comparación (T₂ y T₃) y el grupo testigo (T₁).

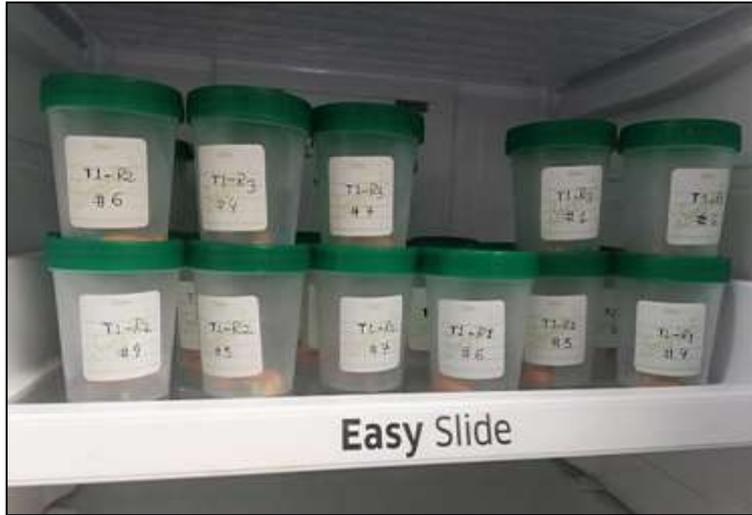


Figura 6: Obtención de muestras para recuento de unidades formadoras de colonias.



Figura 7: Obtención de muestras para histomorfometría.

3.3. Localización

El presente estudio se realizó en un galpón ubicado en el Fundo San Pedro, distrito de Chiclayo, departamento de Lambayeque, con una altura de 40 m.s.n.m., latitud Sur $6^{\circ} 45' 50''$ y longitud Oeste de $79^{\circ} 50' 15''$ (figura 8); durante los meses de noviembre y diciembre del 2018; donde se realizó una temperatura máxima 25.3 y 27.3 °C , temperatura mínima de 18.4 y 20.0 °C, humedad relativa 75 y 71 %, precipitación 1.3 y 4.5 mm, evaporación 2.9 y 2.9 mm, presión atmosférica 1016.5 y 1016.2 mb y viento 4.9 y 4.8 m/s; respectivamente (Fuente: Estación Climatológica Principal de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo (UNPRG) – Lambayeque).

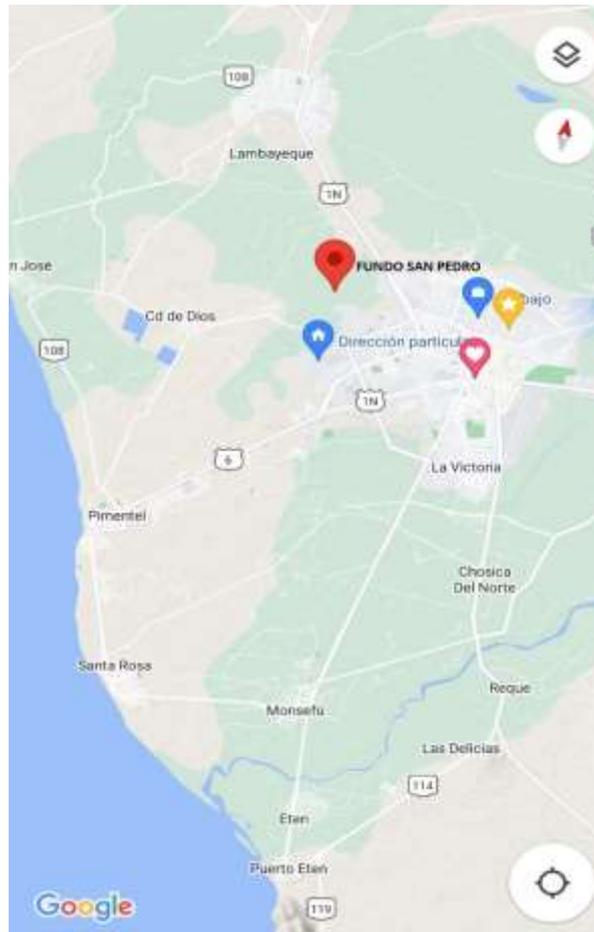


Figura 8: Fundo San Pedro - Chiclayo. (Fuente: Google maps).

3.4. Materiales

3.4.1. Material biológico

Se emplearon 63 pollos machos Cobb 500 procedentes de la empresa Tecniagro S.R.L. de la ciudad de Trujillo, departamento La Libertad; los que llegaron al módulo experimental el 20 de noviembre del 2018, de 1 día de edad y un peso promedio de 41 gramos; un grupo se investigó por 21 días de vida (fase de inicio en la crianza) y el otro durante 35 días de vida; estos se alimentaron con raciones debidamente balanceadas de acuerdo a su edad, las que contenían el acidificante se administraron al grupo T₂ y T₃ en experimentación. También se les suministró agua *ad libitum*.

Las aves fueron vacunadas al tercer día de vida contra el virus de la enfermedad de Newcastle cepa B₁ y contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa cepa H 120 (HIPRAVIAR® - B1/H120) vía ocular; a los 10 días de edad se aplicó vía ocular la vacuna contra la enfermedad de Gumboro (HIPRAGUMBORO® - CH/80) y a los 17 días de edad, recibieron vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa La Sota y contra la enfermedad Bronquitis Infecciosa cepa H 120 (HIPRAVIAR® - S/H120) vía ocular.

3.4.2. Galpón y equipos de crianza

El galpón se construyó en un área de 6.5 metros de largo, 2.5 metros de ancho y una altura de techo de 2.2 metros; se niveló el piso y se colocó una capa de cal; la estructura se hizo con caña Guayaquil (bambú) de 3 metros de longitud y 4 pulgadas de diámetro, se recubrió las paredes y techo con manta arpillera de polipropileno color blanco. Se aplicó como material de cama viruta de madera con un espesor de 4 pulgadas.

Interiormente se distribuyeron los 63 pollos en 9 corrales de 1 metro cuadrado (7 aves por repetición), hechos con marcos de madera y cubiertos con mallas de hilo de pescar (hilo de poliéster),

Se emplearon como materiales: comederos tolva de 1 kilo de capacidad, bebederos con asa de 1 litro de capacidad luego se colocaron comederos tolva de 6 kilos de capacidad y bebederos de 4 litros de capacidad, termohigrómetro digital marca BOECO, papel para piso de recepción, vacunas (HIPRAVIAR® - B1/H120, HIPRAGUMBORO® - CH/80 y HIPRAVIAR® - S/H120), complejo vitamínico + electrolitos marca CHEMI STRESS®, balanza digital VALTOX modelo LDC30N capacidad máxima 30 kilos con un margen de error de 1 gramo, desinfectante VANODINE®, medidor de amoníaco ambiental HYDRION®Ammonia, medidor de pH marca PHMETER modelo PH – 009, alimento balanceado, pulverizador.

3.4.3. Equipos y materiales de laboratorio

Se utilizaron los siguientes equipos: incubadora Memmert modelo IN 110, incubadora Memmert modelo BE 400, estufa de secado Ecocell modelo 111, autoclave vertical Med Group modelo MSLPS06, micrótopo de Minot, microscopio Trinocular Carl Zeiss modelo Primo Star , con cámara digital AxioCam ERc5s.

Los materiales usados fueron: micropipetas, puntas amarillas para micropipetas, caldo de cultivo Mac Conkey y MRS, agar Mac Conkey y MRS, mechero bunsen, asas de siembra, jarras de anaerobiosis, placas Petri, tubos de ensayo, porta y cubreobjetos.

3.4.4. Alimentación

Las aves fueron suministradas con dieta de inicio por un período de 21 días, donde el acidificante fue incorporado en la ración de la siguiente forma: T₁ testigo sin acidificante, T₂ con 0.1% de acidificante y T₃ con 0.2% de acidificante (tabla 4). Las raciones alimenticias cumplieron con un aporte nutricional de proteína cruda: 22%, energía metabolizable: 2975 kcal/kg, calcio: 0.9%, fósforo disponible: 0.45% y fibra cruda de 3.3% (Cobb, 2018).

El acidificante comercial tuvo la composición siguiente: Ácido propiónico, ácido fórmico, ácido ortofosfórico, ácido silícico precipitado y secado, propionato de calcio, mezcla de aromatizantes.

Tabla 4. Raciones de inicio para pollos según el nivel de acidificante.

Ingredientes	Tratamientos		
	T ₁ - testigo	T ₂ - 0.1%	T ₃ - 0.2%
Maíz amarillo	52.67	52.43	52.18
Torta de soya	26.44	26.18	25.92
Harina integral de soya	16.02	16.42	16.83
Aceite de soya	1.50	1.50	1.50
Carbonato de calcio	0.85	0.85	0.85
Fosfato dicálcico	1.72	1.72	1.72
Sal común	0.20	0.20	0.20
Premezcla vitaminas-minerales	0.15	0.15	0.15
Lisina HCl	0.20	0.20	0.20
DL- Metionina	0.25	0.25	0.25
ACIDIFICANTE	0.00	0.10	0.20
Total	100.00	100.00	100.00

Las dietas de crecimiento el acidificante fue incorporado en la ración, T₁ testigo sin acidificante, T₂ con 0.1% de acidificante y T₃ con 0.2% de acidificante (tabla 5). Las raciones alimenticias cumplieron con un aporte nutricional de proteína cruda: 19%, energía metabolizable: 3025 kcal/kg, calcio: 0.84%, fósforo disponible: 0.42% y fibra cruda de 3.3% (Cobb, 2018).

Tabla 5. Raciones de crecimiento para pollos según el nivel de acidificante.

Ingredientes	Tratamientos		
	T ₁ - testigo	T ₂ - 0.1%	T ₃ - 0.2%
Maíz amarillo	62.22	61.98	61.74
Torta de soya	21.19	20.94	20.67
Harina integral de soya	11.84	12.24	12.65
Aceite de soya	1.50	1.50	1.50
Carbonato de calcio	0.82	0.81	0.81
Fosfato dicálcico	1.63	1.63	1.63
Sal común	0.20	0.20	0.20
Premezcla vitaminas-minerales	0.15	0.15	0.15
Lisina HCl	0.20	0.20	0.20
DL- Metionina	0.25	0.25	0.25
ACIDIFICANTE	0.00	0.10	0.20
Total	100.00	100.00	100.00

3.5. Análisis bacteriológico en laboratorio

3.5.1. Cultivo de *Escherichia coli*

3.5.1.1 Preparación de caldo Mac Conkey

Se hizo una suspensión de 35 gramos en 1 litro de agua estéril, se agitó, luego se llevó a ebullición por 1 minuto, rellenándose 32 tubos de ensayo a los 21 días de edad y 31 tubos de ensayo a los 35 días de edad, se llevó a autoclave por 15 minutos a 121 °C, el aspecto es color violeta claro. El valor de pH a 25 °C está en el rango de 7.1 – 7.5. Se incorporó la muestra de heces y se llevó a incubación por 48 horas a 35 °C. La formación de gas y el cambio de color de violeta a amarillo confirma la presencia de *Escherichia coli* (Merck, 2018).

3.5.1.2. Diluciones seriadas para *E. coli*

Se incorporó 1 ml de caldo Mac Conkey positivo a *Escherichia coli* en 9 ml de solución salina fisiológica obteniéndose la dilución $1/10$ o 10^{-1} (figura 9), y así sucesivamente hasta llegar a una dilución de $1/100000$ o 10^{-5} (Bess, 2016).

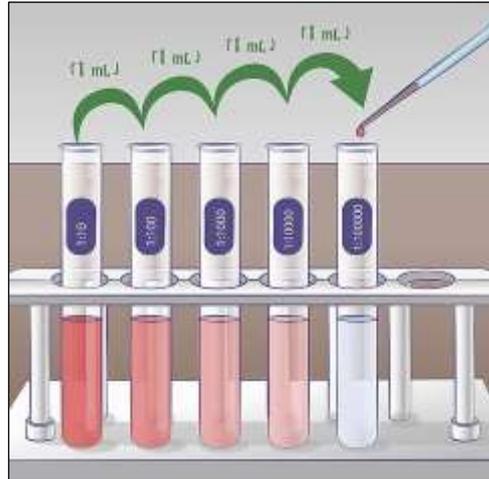


Figura 9: Diluciones seriadas 10^{-5} (Bess, 2016).

3.5.1.3. Preparación agar Mac Conkey

Se disolvió 50 gramos en 1 litro de agua estéril, se dejó reposar por 5 minutos, se calienta mezclando constantemente hasta dejar hervir por 1 minuto, luego se coloca en el autoclave y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C , para posteriormente servir en placas de Petri estériles dentro de una campana de flujo laminar frente al mechero de Bunsen. Dejar solidificar de forma invertida y refrigerar a $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El valor de pH a 25°C está en rango de 6.9 - 7.3. Los medios son de color claro y rojo parduzco a rojo oscuro (Merck, 2018).

3.5.1.4 Siembra en placa agar Mac Conkey

La siembra se realizó en estrías (figura 10), se tomaron muestras usando un anillo de platino estéril y luego se estiraron en un patrón de zigzag continuo sobre la superficie del agar dentro de una campana de flujo laminar frente al mechero de Bunsen (Contreras, 2013).

Se lleva a incubación por 24 horas a 37° C en aerobiosis. Las colonias lactosa positivas son rojas con un halo de turbidez debido a la reducción del pH por los ácidos biliares.

A los 21 días se cultivaron muestras de 21 pollos en placa doble haciendo un total de 64 placas procesadas y a los 35 días se procesaron muestras de los 31 pollos restantes en placa doble haciendo un total de 62 placas procesadas (CBTis 128Equipo 3 - 3°G, 2015)

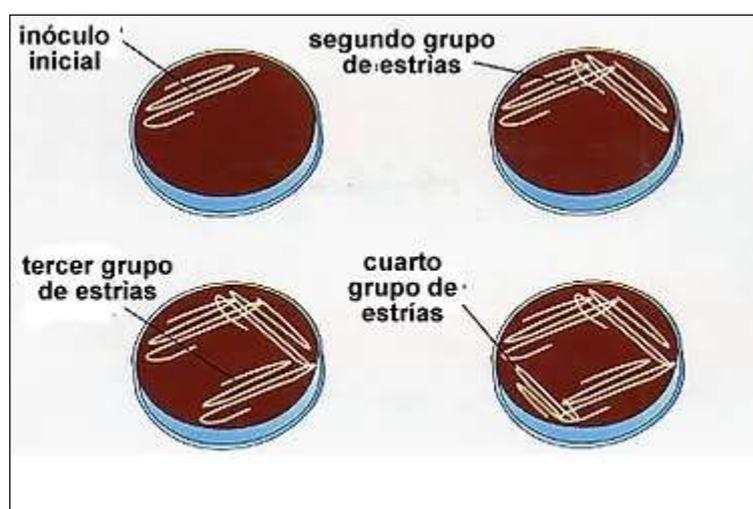


Figura 10: Técnica de siembra por estría en placa.

3.5.1.5 **Conteo de colonias de *Escherichia coli*.**

Se realizó el conteo de ambas placas, luego se saca el promedio y se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias de la placa} \times \text{factor de dilución} *}{ml \text{ de muestra sembrada}}$$

*inversa de la dilución

Luego este valor se convierte en logaritmo. Los resultados de las UFC de *Escherichia coli*, se muestran en el apéndice 1.

3.5.2 **Cultivo de *Lactobacillus***

3.5.2.1 **Preparación de caldo MRS**

Se suspendieron 52.2 gramos del polvo en 1 litro de agua estéril, se agitó, luego se llevó a ebullición por 1 minuto, rellenándose 32 tubos de ensayo a los 21 días de edad y 31 tubos de ensayo a los 35 días de edad, se llevó a autoclave por 15 minutos a 121 °C, el aspecto es color ámbar oscuro. El valor de pH a 25 °C está en el rango de 5.7. Se incorporó la muestra de heces y se llevó a incubación por 72 horas a 35 °C. La presencia de turbidez confirma la presencia de *Lactobacillus* (Merck, 2018).

3.5.2.2 **Diluciones seriadas para *Lactobacillus***

Se incorporó 1 ml de caldo MRS positivo a *Lactobacillus* en 9 ml de solución salina fisiológica obteniéndose la dilución 1/10 o 10⁻¹ (figura 8), y así sucesivamente hasta llegar a una dilución de 1/100000 o 10⁻⁵ (Bess, 2016).

3.5.2.3 Preparación agar MRS

68,25 gramos de polvo disueltos en 1 litro de agua estéril, dejar reposar por 5 minutos, se calienta mezclando constantemente hasta ebullición por 1 minuto, luego se coloca en el autoclave y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C, para posteriormente servir en placas de Petri estériles dentro de una campana de flujo laminar frente al mechero de Bunsen. Dejar solidificar de forma invertida refrigerar a 2-8°C hasta su uso. Los medios son de color marrón claro (Merck, 2018).

3.5.2.4 Siembra en placa agar MRS

La siembra se realizó en estrías (figura 9), se tomaron muestras usando un anillo de platino estéril y luego se estiraron en un patrón de zigzag continuo sobre la superficie del agar dentro de una campana de flujo laminar frente al mechero de Bunsen (Contreras, 2013).

Se lleva a incubación en atmósfera con 5% de CO₂, a 37 °C con campana de anaerobiosis durante 72 horas. Las colonias de *Lactobacillus* son blanco-cremosas convexas y con bordes regulares (Kumar y kumar, 2014).

A los 21 días se cultivaron muestras de 21 pollos en placa doble haciendo un total de 64 placas procesadas y a los 35 días se procesaron muestras de los 31 pollos restantes en placa doble haciendo un total de 62 placas procesadas (CBTis 128Equipo 3 - 3°G, 2015).

3.5.2.5 Conteo de colonias de *Lactobacillus*

Se realizó el conteo de ambas placas, luego se saca el promedio y se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias de la placa} \times \text{factor de dilución} *}{ml \text{ de muestra sembrada}}$$

*inversa de la dilución

Luego este valor se convierte en logaritmo.

Los resultados de las UFC de *Lactobacillus*, se muestran en el apéndice 1.

3.6 Análisis de la histomorfometría intestinal

3.6.1 Obtención de láminas histológicas (Bravo, 2011).

Las muestras se procesaron mediante el siguiente procedimiento:

1.- Fijación: consiste en bloquear la autólisis del tejido y evitar la putrefacción bacteriana post mortem, permitiendo así la observación de una buena estructura celular; el fijador utilizado fue formol tamponado al 10% con pH 7.0.

2.- Deshidratación: Se coloca el tejido en alcoholes de graduación creciente para eliminar el formol (Vásquez, 2014).

Alcohol de 70° (1er baño): 1 hora

Alcohol de 70° (2do baño): 1 hora

Alcohol de 90° (un baño): 1 hora

Alcohol de 96° (un baño): 1 hora

Alcohol de 100° (1er baño): 1 hora

Alcohol de 100° (2do baño): 1 hora

Alcohol Xilol (1er baño): 1/2 hora

Alcohol Xilol (2do baño): 1/2 hora Parafina 56°C – 58°C en estufa a 60°
1/2 hora (1er cambio)

Parafina 56°C – 58°C en estufa a 60° 1/2 hora (2do cambio)

3.- Inclusión definitiva o formación del bloque en parafina: la muestra se coloca en un molde con parafina líquida y se espera su solidificación por enfriamiento.

4.- Corte: Se realizaron cortes de 4 micras de espesor y se fijaron en un portaobjetos, se utilizó un micrótopo de Minot, un baño de flotación con agua destilada a 50°C, se introdujo en una estufa a 58 °C para su secado.

5.- Tinción: Hematoxilina para teñir los núcleos de color azul y Eosina tiñe el citoplasma de color rosado (figura 11).



Figura 11: Láminas procesadas de duodeno.

3.6.2 Histomorfometría de las vellosidades intestinales

Para realizar el estudio de la Histomorfometría de las vellosidades intestinales del duodeno, primero se hizo un estudio microscópico recorriendo toda la lámina y precisando los campos en donde las vellosidades estaban totalmente íntegras y sin ningún artefacto; luego

se tomaron las microfotografías en los campos precisados a estudiar de cada lámina que correspondía a las muestras tomadas de cada ave en estudio (apéndice 4).

De las vellosidades intestinales se tomaron las medidas de altura, ancho, altura de cripta y número de vellosidades en 1 milímetro de longitud. La altura fue medida del ápice a la base de la vellosidad. El ancho, medido de la parte media de la vellosidad. Altura de la cripta, medida de la distancia entre la base de la vellosidad hasta la base de la cripta. Para determinar el número se midió 1 milímetro de longitud paralelo a la base de las vellosidades y se contaron las que se encontraron en esa área (figura 2 y 5). Estas medidas se realizaron considerando las indicaciones de Checcnes (2014).

Para la realización de las medidas se utilizó el software ZEN 2011 de ZEISS y un microscopio trinocular marca CARL ZEISS modelo PRIMO STAR con cámara lúcida digital modelo AXIOCAM ERc5s.

3.7 Procedimiento estadístico

Los datos obtenidos se organizaron de tal manera que se muestren los promedios y las desviaciones estándar, los que permitieron contrastar las hipótesis mediante la prueba “t” de student.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Efecto del acidificante comercial sobre las UFC de *Escherichia coli* en pollos de 21 y 35 días de edad.

<i>E. coli</i>	Edad en días					
	21 d			35 días		
	Log ₁₀ UFC/ml	T ₁ control	T ₂ 0.1 %	T ₃ 0.2%	T ₁ control	T ₂ 0.1%
\bar{X}	6.3	**	** Θ	7.2	**	** Θ
S	0.2	1.9	2.4	0.3	2.6	0.0

** : Altamente significativo, respecto al control

Θ : Altamente significativo, respecto a la edad entre grupos T₃

En la tabla 6 se presenta el efecto del acidificante comercial sobre las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Escherichia coli* en pollos de 21 y 35 días de edad encontrándose en las aves que consumieron el acidificante durante 21 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T₂) y 0.2% (T₃) se obtuvo 0.6 ±1.9 UFC/ml y 1.1 ±2.4 UFC/ml de *Escherichia coli* frente al grupo de aves que no recibieron el acidificante (T₁) en los que se encontró 6.3 ±0.2 UFC/ml, diferencias altamente significativas (p<0.01); demostrando de esta manera su efecto positivo en la reducción de las UFC de *E. coli*.

Asimismo, en los pollos que consumieron durante 35 días se encontró en promedio de 1.1 ±2.6 UFC/ml y 0.0 ±0.0 UFC/ml de *E. coli* en el grupo T₂ y T₃ respectivamente frente al grupo control (T₁) que no recibió el acidificante en los que se encontró un promedio de 7.2 ±0.3 UFC/ml de *E. coli*; diferencias altamente significativas (p<0.01); demostrando también un efecto reductor de las colonias de *E. coli*.

Estos resultados se deben a que el acidificante ejerce su función de 2 formas distintas; una de ellas es disminuir el pH intestinal lo que da como resultado una disminución de las bacterias patógenas como *E. coli*, ya que no encuentran un sitio de adhesión al intestino, porque está tapizado por *Lactobacillus*, este mecanismo se denomina exclusión competitiva (Arana *et al.*, 2017). La segunda función es la acción bactericida; la forma no disociada del ácido penetra la pared celular de la bacteria originando que esta agote toda su energía, y produciéndose la lisis bacteriana (Acosta, 2020).

Si comparamos el efecto de los diferentes grupos T₃ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 1.1 ±2.4 UFC/ml y 0.0 ±0.0 UFC/ml respectivamente diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); demostrando de esta manera el efecto positivo del acidificante sobre las colonias de *E. coli*.

Se observó en cuanto a la dosis de inclusión que con 0.1% hay efecto reductor de UFC significativo resultados que concuerdan con Amaguaña, (2012) respecto al tiempo, hay mejor respuesta con 0.2% a los 35 días de edad; la mayoría de acidificantes comerciales ejercen su efecto en dosis de inclusión en la dieta balanceada, que oscilan de 0.1% a 0.3%.

Los resultados muestran que el uso del acidificante comercial ejerce un efecto positivo en cuanto a la reducción de las UFC de *Escherichia coli*, lo que concuerda con lo descrito por Khodambashi *et al.*, (2017) quien concluyó sobre la capacidad de mejorar de forma positiva la microbiota gastrointestinal con la adición de ácidos orgánicos ya que estos redujeron de forma muy significativa las cepas de *Escherichia coli* cepa enterotoxigénica.

Cabe remarcar la importancia que tienen los *Lactobacillus* en la salud intestinal: tal es así que se determinó en histopatología un aumento de la inmunidad humoral local en el intestino delgado, mejorando la salud intestinal, esto debe al aumento de *Lactobacillus* con el uso de acidificantes corroborando los resultados alcanzados (Jurado-Gámez y Zambrano-Mora, 2020); asimismo, Wang *et al.*, (2017) tuvo como propósito evaluar la eficacia de *Lactobacillus B1* en los pollos, obteniendo como resultado que la dieta ejecutada disminuyó la *Escherichia coli* en el contenido cecal y aumentó las bacterias cecales de ácido láctico, además de aumentar la concentración secretora de inmunoglobulina A en la mucosa ileal y reducir los niveles del factor de necrosis tumoral. Concluyendo que la suplementación de *Lactobacillus B1* promueve el crecimiento y aumenta la población de *Lactobacillus*, mejorando la inmunidad de la mucosa intestinal, dichos resultados concuerdan con el aumento de UFC de *Lactobacillus* y la disminución de UFC de *Escherichia coli*.

Así también Acosta, (2020) destacó en estudios en aves de la línea Rhode Island con ácido acético y *Capsicum annum* var. *annuum* (pimiento morrón) mejoraron la calidad de huevos en torno al cascarón y porcentaje de puesta. Concluyendo una buena salud intestinal por efecto directo del acidificante (ácido acético) ya que este ejerce su función de dos maneras: reduciendo el pH el cual impide el desarrollo patógeno de *Escherichia coli*, *Clostridium* y *Salmonella*; y la segunda forma es una acción bactericida especialmente de bacterias Gram negativas. Cuando se tiene una microbiota intestinal en equilibrio (eubiosis) los *Lactobacillus* producen sustancias que inhiben directamente a las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*); mediante la producción de: bacteriocinas, ácidos orgánicos, diacetilo y peróxido de Hidrógeno (Blajman *et al.*, 2015). Efecto encontrado en este estudio científico.

Tabla 7. Efecto del acidificante comercial sobre las UFC de *Lactobacillus* en pollos de 21 y 35 días de edad.

<i>Lactobacillus</i>	Edad en días					
	21 días			35 días		
Log ₁₀ UFC/ml	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%
\bar{x}	3.8	6.4** ^O	6.4** ^Θ	4.0	7.3** ^O	7.1** ^Θ
s	3.1	0.1	0.1	3.4	0.3	0.1

**^O: Altamente significativo, respecto al control.

^O: Altamente significativo, respecto a la edad entre grupos T₂.

^Θ: Altamente significativo, respecto a la edad entre grupos T₃.

La tabla 7 se muestra el efecto del acidificante comercial sobre las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus* en pollos de 21 y 35 días de edad. encontrándose en las aves que consumieron el acidificante durante 21 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T₂) y 0.2% (T₃) se obtuvo 6.4 ±0.1 UFC/ml y 6.4 ±0.1 UFC/ml de *Lactobacillus* respecto al grupo de aves que no recibieron el acidificante (T₁) en los que se encontró 3.8 ±3.1 UFC/ml, diferencias altamente significativas (p<0.01); demostrando de esta manera su efecto positivo en el aumento de las UFC de *Lactobacillus*.

Asimismo, en los pollos que consumieron durante 35 días se encontró en promedio de 7.3 ±0.3 UFC/ml y 7.1 ±0.1 UFC/ml de *Lactobacillus* en el grupo T₂ y T₃ respectivamente frente al grupo control (T₁) que no recibió el acidificante en los que se encontró un promedio de 4.0 ±3.4 UFC/ml de *Lactobacillus*; diferencias altamente significativas (p<0.01); obteniéndose también un efecto reductor de las colonias de *Lactobacillus*.

Si comparamos el efecto de los diferentes grupos T₂ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 6.4 ±0.1 UFC/ml y 7.3 ±0.1 UFC/ml respectivamente diferencias altamente

significativas ($p < 0.01$); igualmente se encontró el efecto positivo al comparar diferentes grupos T₃ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 6.4 ± 0.1 UFC/ml y 7.1 ± 0.1 UFC/ml diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

Los pollos del grupo control aumentan en bajas cantidades las UFC de *Lactobacillus* ($\bar{x} = 3.8$ y 4.0 Log₁₀ UFC/ml) a los 21 y 35 días de edad. Sin embargo, con el tratamiento donde se le acrecienta 0.1% de acidificante comercial a los 35 días los pollos aumentan significativamente las UFC de *Lactobacillus* ($\bar{x} = 7.3$ Log₁₀ UFC/ml) y con el tercer tratamiento donde se le amplifica a 0.2% de acidificante comercial también se precisa un aumento significativo ($\bar{x} = 7.1$ Log₁₀ UFC/ml). Por lo que hay evidencia estadística que las dosis de acidificante aumentan las UFC de *Lactobacillus* en pollos machos Cobb 500.

En cuanto al tiempo de aplicación, hay una diferencia extensa entre aplicarlos por solo 21 días y aplicarlo por 35 días; existiendo una evidencia estadística de haber mejores resultados en un tiempo más prolongado. En cuanto a la dosis utilizada, se obtuvieron resultados satisfactorios con tan solo aplicar 0.1% de acidificante comercial, con la finalidad de aumentar las UFC de *Lactobacillus*.

Estos datos tienen correspondencia con lo encontrado por Simbaña (2019) en su estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes dosis de *Lactobacillus* en parámetros productivos y características morfométricas, en el cual obtuvo como resultado que la bacteria ejerce un efecto positivo en el aumento de la microbiota intestinal; además de aplicar una dosis de 3 ml, tuvo un incremento de 64.4% de la flora benéfica; mejorando el sistema inmunológico del animal.

El estudio realizado por Álvarez y Gómez (2020) evidenciaron diferencias significativas en el recuento de UFC de *Escherichia coli*, donde notaron mejoras en la

producción de bacterias benéficas (*Lactobacillus*) en los conductos intestinales cuando fueron sometidos a la suplementación de *Allium sativum*. Así como también los estudios de Herrera, (2017). Resultados similares a los reportados en este estudio.

Tabla 8. Efecto del acidificante comercial sobre la altura de la vellosidad intestinal en pollos de 21 y 35 días de edad.

Altura vellosidad μm	Edad en días					
	21 días			35 días		
	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%
\bar{X}	1206.6	1200.7** ^o	1262.4** ^o	1484.5	1411.0** ^o	1569.3** ^o
s	176.0	151.4	380.3	173.8	267.0	198.0

** : No se presentaron significativas, respecto al control.

^o : No se presentaron significativas, respecto a la edad entre grupos T₂.

^o : No se presentaron significativas, respecto a la edad entre grupos T₃.

En tabla 8 se muestra el efecto del acidificante comercial sobre la altura de la vellosidad en pollos de 21 y 35 días de edad, encontrándose en las aves que consumieron el acidificante durante 21 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T₂) y 0.2% (T₃) 1200.7 ±151.4 μm y 1262.4 ±380.3 μm de altura de vellosidad frente al grupo de aves que no recibieron el acidificante (T₁) en los que se encontró 1206.6 ±176.0 μm de altura de vellosidad, diferencias que no son significativas (p>0.01) Asimismo, en los pollos que consumieron durante 35 días se encontró en promedio de 1411.0 ±267.0 μm y 1569.3 ±198.0 μm de altura de vellosidad en el grupo T₂ y T₃ respectivamente frente al grupo control (T₁) que no recibió el acidificante en los que se encontró un promedio de 1484.5 ±173.8 μm de altura de vellosidad; diferencias que no significativas estadísticamente (p>0.01).

Si comparamos el efecto de los diferentes grupos T₂ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 1200.7 ±151.4 μm y 1411.0 ±267.0 μm de altura de vellosidad respectivamente diferencias no significativas (p>0.01); igualmente no se encontró el efecto al comparar diferentes grupos T₃ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 1262.4 ±380.3 μm y 1569.3 ±198.0 μm de altura de vellosidad diferencias no significativas (p>0.01).

Tabla 9. Efecto del acidificante comercial sobre el ancho de la vellosidad intestinal en pollos de 21 y 35 días de edad.

Ancho vellosidad		Edad en días				
		21 días			35 días	
μm	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%
\bar{X}	87.5	94.3** ^o	102.9** ^o	106.6	112.1** ^o	117.0** ^o
s	18.3	15.6	20.7	13.2	21.3	15.4

** : No se presentaron significativas, respecto al control.

^o : No se presentaron significativas, respecto a la edad entre grupos T₂.

^o : No se presentaron significativas, respecto a la edad entre grupos T₃.

La tabla 9 presenta el efecto del acidificante comercial sobre el ancho de vellosidad en pollos de 21 y 35 días de edad, encontrándose en las aves que consumieron el acidificante durante 21 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T₂) y 0.2% (T₃) se obtuvo 94.3 ±15.6 μm y 102.9 ±20.7 μm de ancho de vellosidad frente al grupo de aves que no recibieron el acidificante (T₁) en los que se encontró 87.5 ±18.3 μm de altura de vellosidad, diferencias que no son significativas (p>0.01) Asimismo, en los pollos que consumieron durante 35 días se encontró en promedio de 112.1 ±21.3 μm y 117.0 ±15.4 μm de ancho de vellosidad en el grupo T₂ y T₃ respectivamente frente al grupo control (T₁) que no recibió el acidificante en los que se encontró un promedio de 106.6 ±13.2 μm de ancho de vellosidad; diferencias no significativas estadísticamente (p>0.01).

Si comparamos el efecto de los diferentes grupos T₂ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 94.3 ±15.6 μm y 112.1 ±21.3 μm de ancho de vellosidad respectivamente, diferencias no significativas (p>0.01); igualmente no se encontró el efecto al comparar diferentes grupos T₃ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 102.9 ±20.7 μm y 117.0 ±15.4 μm de ancho de vellosidad diferencias no significativas (p>0.01).

Estos resultados registrados no presentaron diferencias significativas en ningún grupo frente al control. No presentaron diferencias significativas en ningún grupo respecto a la edad de 21 y 35 días respectivamente entre grupos T₂ (0.1% de acidificante comercial) y T₃ (0.2% de acidificante comercial).

Tabla 10. Efecto del acidificante comercial sobre la altura de cripta de la vellosidad intestinal en pollos de 21 y 35 días de edad.

Altura cripta	Edad en días					
	21 días			35 días		
μm	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%
\bar{X}	96.8	94.3** Θ	102.9** Θ	106.6	112.1** Θ	117. $\infty\Theta$
s	18.1	30.4	30.0	18.2	213.9	28.4

** : No se presentaron significativas, respecto al control.

∞ : Altamente significativo, respecto al control de 35 días entre grupo T₃.

Θ : No se presentaron significativas, respecto a la edad entre grupos T₂.

Θ : No se presentaron significativas, respecto a la edad entre grupos T₃.

La siguiente tabla 10 indica el efecto del acidificante comercial sobre la altura de cripta en pollos de 21 y 35 días de edad, encontrándose en las aves que consumieron el acidificante durante 21 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T₂) y 0.2% (T₃) se obtuvo 99.5 ±30.4 μm y 107.9 ±30.0 μm de altura de cripta frente al grupo de aves que no recibieron el acidificante (T₁) en los que se encontró 96.8 ±18.1 μm de altura de

cripta, diferencias que no son significativas ($p>0.01$) Asimismo, en los pollos que consumieron durante 35 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T_2) encontró en promedio de $197.8 \pm 213.9 \mu\text{m}$ de altura de cripta frente al grupo control (T_1) que no recibió el acidificante en los que se encontró un promedio de $99.5 \pm 18.2 \mu\text{m}$ de altura de cripta; diferencias no significativas estadísticamente ($p>0.01$).

Los pollos que consumieron durante 35 días de vida en un porcentaje del 0.2% (T_3) se encontró en promedio de $146.7 \pm 28.4 \mu\text{m}$ de altura de cripta frente al grupo control (T_1) que no recibió el acidificante en los que se encontró un promedio de $99.5 \pm 18.2 \mu\text{m}$ de altura de cripta; diferencias altamente significativas estadísticamente ($p<0.01$).

Si comparamos el efecto de los diferentes grupos T_2 a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: $99.5 \pm 30.4 \mu\text{m}$ y $197.8 \pm 213.9 \mu\text{m}$ de altura de cripta respectivamente, diferencias no significativas ($p>0.01$); igualmente no se encontró el efecto al comparar diferentes grupos T_3 a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: $107.9 \pm 30.0 \mu\text{m}$ y $146.7 \pm 28.4 \mu\text{m}$ de altura de cripta diferencias no significativas ($p>0.01$).

Tabla 11. Efecto del acidificante comercial sobre el número de vellosidades intestinales por milímetro en pollos de 21 y 35 días de edad.

Número vellosidades mm	Edad en días					
	21 días			35 días		
	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%	T ₁ control	T ₂ 0.1%	T ₃ 0.2%
\bar{X}	10.5	10.7 ^O	10.5 ^Ø	9.2	8.2* ^O	8.5 ^Ø
s	1.8	1.3	1.7	1.0	1.5	1.4

* Diferencia significativa respecto al control de 35 días entre grupo T₃

O: Altamente significativo, respecto a la edad entre grupos T₂

Ø: Altamente significativo, respecto a la edad entre grupos T₃

La tabla 11 se muestra el efecto del acidificante comercial sobre el número de vellosidades intestinales por milímetro en pollos de 21 y 35 días de edad, encontrándose en las aves que consumieron el acidificante durante 35 días de vida en un porcentaje del 0.1% (T₂) se obtuvo 8.2 ± 1.5 vellosidades por milímetro frente al grupo de aves que no recibieron el acidificante (T₁) en los que se encontró 9.2 ± 1.0 vellosidades por milímetro, diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

Si comparamos el efecto de los diferentes grupos T₂ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 10.7 ± 1.3 y 8.2 ± 1.5 vellosidades por milímetro, respectivamente diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); igualmente al comparar diferentes grupos T₃ a los 21 y 35 días de vida se obtuvo: 10.5 ± 1.7 y 8.5 ± 1.4 vellosidades por milímetro, diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

Los resultados evidencian que el acidificante no modificó la histomorfometría intestinal concordando con lo descrito por los siguientes autores: Nicoletti *et al.*, (2010) quienes evaluaron una dieta con la inclusión de un producto comercial que contenía ácidos orgánicos y pared de levadura hidrolizada donde se midió

la altura de las vellosidades intestinales y la profundidad de cripta; encontrando que la altura de las vellosidades de aves con producto comercial fue similar o menor (días 21 $\bar{X} = 1669.8 \mu\text{m}$ y $S = 216.5 \mu\text{m}$; y días 35 $\bar{X} = 1923.8 \mu\text{m}$ y $S = 243.1 \mu\text{m}$) que el grupo control (días 21 $\bar{X} = 1703.5 \mu\text{m}$ y $S = 133.0 \mu\text{m}$; y días 35 $\bar{X} = 1965.3 \mu\text{m}$ y $S = 196.3 \mu\text{m}$) a los que recibieron el ácido orgánico, a pesar de hallarse mejoras en los parámetros productivos.

La altura de la vellosidad intestinal tiene un desarrollo con tendencia a incrementarse a medida que pasa el tiempo, esto fue demostrado en el trabajo realizado por Nasrin *et al.*, (2012) quien evaluó las vellosidades en los días 1, 14 y 28 de edad de los pollos obteniendo promedios: día 1 $\bar{X} = 1080 \mu\text{m}$ y $S = 280.0 \mu\text{m}$; día 14 $\bar{X} = 1022 \mu\text{m}$ y $S = 507.5 \mu\text{m}$ y día 28 $\bar{X} = 2287 \mu\text{m}$ y $S = 870.7 \mu\text{m}$.

Incluso teniendo recuentos elevados de UFC de *Lactobacillus*, no se evidencia aumento significativo de la altura de la vellosidad intestinal; control a los 12 días de edad $\bar{X} = 983.0 \mu\text{m}$ y $S = 222.0 \mu\text{m}$ respecto al T3 con $\bar{X} = 1010.0 \mu\text{m}$ y $S = 131.0$; esto fue estudiado por Herrera (2018).

Con respecto a los resultados, se aprecia que ancho de la vellosidad intestinal tiene un desarrollo con tendencia a incrementarse a medida que pasa el tiempo, esto fue demostrado en el trabajo realizado por Nasrin *et al.*,(2012) quien midió el ancho de las vellosidades en los días 1, 14 y 28 de edad de los pollos obteniendo promedios: día 1 $\bar{X} = 72.5 \mu\text{m}$ y $S = 0.3 \mu\text{m}$; día 14 $\bar{X} = 101.7 \mu\text{m}$ y $S = 0.3 \mu\text{m}$ y día 28 $\bar{X} = 123.2 \mu\text{m}$ y $S = 0.6 \mu\text{m}$.

Cuando Nicoletti *et al.*, (2010) evaluó la altura de la vellosidad intestinal y profundidad de la cripta (distancia o altura de la invaginación entre dos vellosidades

intestinales observó valores totalmente inversos los días 21 y 35 de edad, por lo cual recomienda recurrir a nuevos estudios experimentales con inclusión de otras dosis y en diferentes edades. Para el día 21 de edad se obtuvo $\bar{x} = 271.3 \mu\text{m}$ y $S = 47.3 \mu\text{m}$ estos valores son estadísticamente diferentes con un nivel de significancia (alfa) del 5% respecto del grupo que recibió ácido orgánico comercial $\bar{x} = 286.3 \mu\text{m}$ y $S = 47.3$; y para el día 35 de edad el autor no encontró diferencia significativa respecto del control $\bar{x} = 375.7 \mu\text{m}$ y $S = 46.4$ con el grupo que recibió al acidificante $\bar{x} = 378.3 \mu\text{m}$ y $S = 64.7$.

Según González *et al.*, (2016) realizó un estudio en pollos a los 42 días de edad con el propósito de evaluar los probióticos sobre los índices productivos y la morfometría de las vellosidades intestinales, utilizando dos tipos de tratamientos, el tratamiento A (cultivo microbiano casero) y el tratamiento B (probiótico comercial) en el cual pudo determinar que el tratamiento A es el más indicado para la variable altura y ancho de vellosidad, más no así para la variable profundidad de cripta $\bar{x} = 265.7 \mu\text{m}$ el cual no es significativo frente al tratamiento B $\bar{x} = 251,3 \mu\text{m}$.

Resultados similares realizó Olivia (2019) en un estudio referente al tracto gastrointestinal del pollo, ejecutando dos funciones básicas: la primera se basa en la adquisición y asimilación de nutrientes; la segunda se basa en el mantenimiento de una barrera protectora contra las infecciones microbianas y virales. Son muchos los factores que pueden influenciar el desempeño de las funciones de protección, por eso se considera importante el estudio de los estímulos inmunitarios, la nutrición, el tamaño de las dosis, la calidad de los ingredientes de la ración y las toxinas, pues consiste en evaluar de, manera interna las secreciones endógenas, por los que pasa el pollo en cada fase. Además, se debe formar una relación en cuanto al tiempo y el tamaño de la dosis, para encontrar realmente lo que afecta al tracto intestinal.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- ✓ Las UFC de *Escherichia coli*, de los grupos de aves que recibieron 0.1% y 0.2% de acidificante comercial a los 21 y 35 días de vida, fueron más bajas respecto al grupo control.

- ✓ Las UFC de *Lactobacillus* fueron más altas en los grupos que recibieron el 0.1% y 0.2% de acidificante comercial, evidenciándose un mejor resultado en las aves de 35 días.

- ✓ No se presentó efecto del acidificante comercial sobre la altura, ancho y profundidad de las vellosidades intestinales en ningún tratamiento.

5.2. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda el uso del acidificante comercial, debido a que promueve el incremento de las UFC de *Lactobacillus* y reduce significativamente las UFC de *E. coli*, repercutiendo en una buena salud intestinal de las aves. La concentración sugerida es del 0.1%.
- ✓ Se recomienda que se profundice el estudio del efecto del acidificante comercial, en otras edades y líneas de aves, evaluando el número de vellosidades intestinales y parámetros productivos.

LISTA DE REFERENCIAS

- Acosta, A. 2020. Evaluación de la adición de ácido acético y pimiento morrón en dieta para aves de postura variedad Rhode Island. Available at: <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/evaluacion-adicion-acido-acetico-t45012.htm>.
- Aidara-Kane, A. 2015. Cuáles son los riesgos de consumir pollo con antibiótico Available at: https://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/03/150305_salud_riesgos_consumo_pollos_con_antibioticos_lv.
- Álvarez, D y Gómez, J. 2020. Efecto de la suplementación de *Allium sativum* en la población de agentes patógenos intestinales y patógenos intestinales y parámetros productivos en pollos de engorde. Tesis de licenciatura, Universidad la Salle.
- Amaguaña, W. 2012. Uso de acidificantes en la producción de pollos broilers. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2118> - Escuela-superior-politecnica-de-chimborazo-facultad-de-ciencias-pecuarias-escuela-de-ingenieria-zootecnica.html.
- Arana, R., Franco, F., Ramírez, J., Cangá, E., Zambrano, N., Álvarez, G., y Chacón, E. 2017. "Empleo de acidificantes intestinales en la producción de pollos de ceiba". *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 18, núm.12, pp.1-9 [Consultado: 4 de julio de 2022]. ISSN: Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63654640020>.
- Ballena, B. 2015. Esquema del epitelio del intestino delgado. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Cripta_de_Lieberk%C3%BChn#/media/Archivo:Esquema_del_epitelio_del_intestino_delgado.png [Consultado 26-06-2022].
- Barrett, K., Barman, S., Boitano, S. y Brooks, H. 2010. *Ganong Fisiología médica*. 23^a ed. México, D.F.: McGraw-Hill. Disponible en: <http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/0440.%20Ganong.%20Fisiolog%C3%ADa%20m%C3%A9dica.pdf> [Consultado 29-03-2021].
- Bess, 2016. Cómo hacer diluciones seriadas. Disponible en : <https://es.wikihow.com/hacer-diluciones-seriadas> [Consultado 04-06-2022].
- Blajman, J., *et al*, 2015 "Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos" *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), pp. 360-367.

- Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revistaargentina-microbiologia-372-articulo-probioticos-pollos-parrilleros-una-estrategia-S0325754115001133>. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002>.
- BRAVO M. 2011. Manual de procedimientos y técnicas histopatológicas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo – Morelia, Michoacan – México. 75 p.
- Carvajal, E., Hernández, W., Torres, M., López, D., Rueda, E., y Vásquez, M. 2019. "Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de CONTENIDO s de bursa de Fabricio de aves para engorde". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), pp. 430 - 437. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000100042. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14648>.
- CBTis 128 Equipo 3 - 3°G , 2015 . 11. Tipos y medios de cultivo, Microbiología. Obtenido de; <https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/tipos-y-medios-de-cultivo> [Consultado 04-06-2022].
- Cervantes, E. 2021. "Diagrama de Ishikagua aplicado al procesamiento de pollos". *Revista aviNews España Febrero*, 1(47), pp. 1 - 124. Disponible en: <https://issuu.com/avinews/docs/avinews-es-febrero2021> .
- Contreras, 2013. Método de siembra en estría. <https://seramix.blogs.uv.es/2013/05/02/metodo-de-siembra-en-estria/> [Consultado 04-06-2022].
- Cobb, 2018. Cobb 500TM Suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición de pollos de engorde https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/232e88a842/Cobb500-Broiler-Supplement_Spanish.pdf. [Consultado 26-06-2022].
- Checnes, N. 2014. *Morfometría de la mucosa del intestino delgado de crías de alpacas (Vicugna pacos)*. Disponible en: <https://docplayer.es/80105854-Morfometria-de-la-mucosa-del-intestino-delgado-de-crias-de-alpacas-vicugna-pacos-tesis-para-optar-el-titulo-profesional-de-medico-veterinario.html> [Consultado 29-03-2021].

- Cherrington, C., Hinton, M., Mead, G. y Chopra, I. 1991. "Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications". *Advances in Microbial Physiology*, 32(1), pp. 87 - 108. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065291108600065> .
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60006-5)
- Gauthier, R., Bodln, J., y Oller, A. 2011. "Alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento para pollos. *JEFO*". *Selecciones Avícolas*, 1(1), pp. 19 - 23. Disponible en: <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2011/12/6439-alternativa-a-los-antibioticos-promotores-de-crecimiento-para-los-pollos.pdf>
- González, I., Montero, M., Guerrero, L. y Villamarín, D. 2016. *Evaluación de probióticos sobre los índices productivos y lamorfometría de las vellosidades intestinales en pollos de engorde*. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23314/1/Tesis%2051%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20408.pdf> [Consultado 29-03-2021].
- Herrera, J. 2018. *Evaluación de la protección conferida por Lactobacillus reuteri como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal*. Disponible en: <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1687> [Consultado 29-03-2021].
- Herrera, S. 2017. *Efecto del uso de un probiótico elaborado a partir de cultivos intestinales sobre la performance de un lote de pollos broiler cobb 500, Arequipa- 2016*. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/198130066.pdf>.
- Jurado-Gámez, H. y Zambrano- Mora, E. 2020. "Efecto de *Lactobacillus casei* microencapsulado sobre la salud intestinal y parámetros bioquímicos y productivos en pollo de engorde". *Actualidad & Divulgación Científica*, 23(2), pp.1-4. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1480/1980#citations> [Consultado 29-03-2021]. <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n2.2020.1480>.
- Khodambashi, N., Daneshmand, A., Zafari, S., Graystone EN y LJ Broom. 2017. "Efectos de las mezclas comerciales de ácidos orgánicos en pollos de engorde machos expuestos a *E. coli* K88: rendimiento, microbiología, morfología intestinal y respuesta inmunitaria". *Ciencia avícola* Volumen 96, número 9, pp 3254 – 3263. <https://doi.org/10.3382/ps/pex106>.

- Kumar, A., y Kumar, D. 2014. Isolation and characterization of bacteria from dairy samples of Solan in Himachal Pradesh for identification of *Lactobacillus spp*
 Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/261401834_Isolation_and_characterization_of_bacteria_from_dairy_samples_of_Solan_in_Himachal_Pradesh_for_identification_of_Lactobacillus_spp [Consultado 04-06-2022].
- Maps, G. 2022. Mapa de Chiclayo. Available at: <https://www.google.com.pe/maps/@-6.7576473,-79.8834373,96m/data=!3m1!1e3?hl=es-419> [Consultado 26-06-2022].
- Merck, 2018. https://www.merckmillipore.com/PE/es/products/industrial-microbiology/culture-media/culture-media-for-pharmaceutical-and-cosmetics-industry/dehydrated-culture-media/dilution-enrichment-microbial-enumeration/IgSb.qB.r18AAAFAY_xkiQpx,nav [Consultado 04-06-2022].
- Nasrin, M., Siddiqi, MNH, Masum, MA y Wares, MA. 2012. "Estudios brutos e histológicos del tracto digestivo de los pollos de engorde durante el crecimiento y desarrollo posnatal", *Revista de la Universidad Agrícola de Bangladesh*, 10(1), págs. 69–77. Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/JBAU/article/view/12096> (Consultado: 5 de julio de 2022).
- Nicoletti, D., Flores, C., Terraes, J. y Kuttel, J. 2010. Parámetros productivos y morfológicos en pollos parrilleros suplementados con ácidos orgánicos y levadura. *Revista veterinaria* volumen 21, número 1, pp 23-27. <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065291108600065> [Consultado 29-03-2021].
- Oliva, S. 2019. Comparación del uso de alhído de canela y simbiótico en la ganancia de peso vivo de pollos de engorde cobb - 500, Pomalca, periodo octubre del 2018, febrero 2019, Disponible en: <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/4346/BC-TES-3201%20OLIVA%20CHUYO.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. [Consultado 29-03-2021].
- Olveira, G. y González-Molero, I. 2016. "Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica". *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), pp. 482-494. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-actualizacion-probioticos-prebioticos-simbioticos-nutricion-S1575092216301139> [Consultado 29-03-2021].

- Olvera, 2022. Importancia de la microbiota intestinal de las aves y su posible regulación con el uso de fibras Disponible en: <https://www.avicultura.mx/destacado/importancia-de-la-microbiota-intestinal-de-las-aves-y-su-possible-regulacion-con-el-uso-de-fibras>. [Consultado 03-06-2022].
- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (2021). *Producción y productos avícolas*. Disponible en: <http://www.fao.org/poultryproduction/products/production/nutrition/feeding/es/>. [Consultado 29-03-2021].
- Organización Mundial de la Salud 2021. *Escherichia coli*. Disponible en: https://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/ [Consultado 29-03-2021].
- Ovidio-Rondón, E. 2019. "Revisión sobre la salud intestinal de las aves". *Animal Feed Science & Tech*, 250(4), pp. 1 - 18. Disponible en: <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2019/6/10-19-SA201906-SALUD-AVIAR-revision-salud-intestinal-de-las-aves.pdf> [Consultado 29-03-2021].
- Pelicano, E., Alves, P., Alves, H., Obab, A., Norkusc, E., Kodawarac, L. y Azevedo, T. 2003. "Intestinal Mucosa Structure and Ultrastructure in Broilers fed with Diets supplemented with different Probiotics". *Revista portuguesa de ciencias veterinarias*, 98(547), pp. 125 - 134. Disponible en: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf9_2003/547_125_134.pdf [Consultado 29-03-2021].
- Quiroa, A. 2019. *Utilización de bacillus subtilis como probiótico en pollos de engorde para la reducción de Escherichía coli*. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/11316/1/Tesis%20MV%20Alice%20Quiroa.pdf>. [Consultado 29-03-2021].
- Real Escuela de Avicultura, 2017. *Suministro de alimento sostenible para la producción avícola mundial*. Disponible en: <https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2017/07/suministro-alimento-sostenible-produccion-avicola-mundial> [Consultado 29-03-2021].
- Rodríguez, S. y Moreno, G. 2016. "*Lactobacillus spp.* effect evaluation in the small intestine development in broiler chickens". *Revista Ciencia y Agricultura*, 13(1), pp. 49 - 58. Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_agricultura/article/view/4805.

[Consultado 29-03-2021].

- Simbaña, D. 2019. *Efecto de la inclusión de lactobacillus acidophilus sobre el rendimiento productivo en pollos broiler, en la granja experimental, La pradera*. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/9856/2/03%20AGP%20248%20TRABAJO%20GRADO.pdf> [Consultado 29-03-2021].
- Vásquez, 2014. Cambios hormonales y anátomo histológicos del aparato reproductor de la gallina ponedora hy-line en estado de cluequés. Disponible en <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/1956/TESIS%20DOCTORAL%20V%c3%81SQUEZ%20S%c3%81NCHEZ%20GLORIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .
- Wang, S., Peng, Q., Jia, M., Zeng, F., Zhu, L., Hou, L., Liu, T., Yang, J., y Qiao, Y. 2017. "Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with *Lactobacillus plantarum* B1". *Poultry Science*, 96(8), pp. 2576-2586. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119314543> [Consultado 29-03-2021].

APÉNDICE

Apéndice 1: Guías de observación de las Unidades formadoras de colonias.

T 1 - R 1 LACTOBACILLUS 21 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
4	8	9	8.5	10 ⁻⁵	9 X 10 ⁵	UFC/ml	5.9 LOG 10 UFC/ml
5	10	9	9.5	10 ⁻⁵	1 X 10 ⁶	UFC/ml	6.0 LOG 10 UFC/ml
6	14	13	13.5	10 ⁻⁵	1.3 X 10 ⁶	UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml

T 1 - R 1 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
4	16	18	17	10 ⁻⁵	1.7 X 10 ⁶	UFC/ml	6.2 LOG 10 UFC/ml
5	16	14	15	10 ⁻⁵	1.5 X 10 ⁶	UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml
6	11	13	12	10 ⁻⁵	1.2 X 10 ⁶	UFC/ml	6.0 LOG 10 UFC/ml

T 1 - R 2 LACTOBACILLUS 21 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
4	0	0	0	10 ⁻⁵	0	UFC/ml	0 UFC/ml
5	8	9	8.5	10 ⁻⁵	9 X 10 ⁵	UFC/ml	5.9 LOG 10 UFC/ml
6	12	16	14	10 ⁻⁵	1.4 X 10 ⁶	UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml
7	20	19	19.5	10 ⁻⁵	2 X 10 ⁶	UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml

T 1 - R 2 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
4	42	39	40.5	10 ⁻⁵	4.1 X 10 ⁶ UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml	
5	19	21	20	10 ⁻⁵	2 X 10 ⁶ UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml	
6	12	13	12.5	10 ⁻⁵	1.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml	
7	10	13	11.5	10 ⁻⁵	1.2 X 10 ⁶ UFC/ml	6 LOG 10 UFC/ml	

T 1 - R 3 LACTOBACILLUS 21 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
1	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
4	11	9	10	10 ⁻⁵	1 X 10 ⁶ UFC/ml	6 LOG 10 UFC/ml	
6	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
7	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	

T 1 - R 3 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
1	20	25	22.5	10 ⁻⁵	2.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml	
4	14	15	14.5	10 ⁻⁵	1.5 X 10 ⁶ UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml	
6	40	39	39.5	10 ⁻⁵	4 X 10 ⁶ UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml	
7	34	38	36	10 ⁻⁵	3.6 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml	

T 2 - R 1 LACTOBACILLUS 21 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
3	32	34	33	10 ⁻⁵	3.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml	
5	34	40	37	10 ⁻⁵	3.7 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml	
7	28	32	30	10 ⁻⁵	3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml	

T 2 - R 1 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO DE COLONIAS	LOGARITMO	
3	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
5	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
7	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	

T 2 - R 2 LACTOBACILLUS 21 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
1	19	23	21	10 ⁻⁵	2.1 X 10 ⁶ UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml	
2	27	30	28.5	10 ⁻⁵	2.9 X 10 ⁶ UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml	
5	32	40	36	10 ⁻⁵	3.6 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml	

T 2 - R 2 E. COLI						
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F DILUCION	CONTEO DE COLONIAS	LOGARITMO
1	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml
2	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml
5	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml

T 2 - R 3 LACTOBACILLUS 21 DIAS						
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
1	26	26	26	10 ^ -5	2.6 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml
3	38	40	39	10 ^ -5	3.9 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml
5	20	25	22.5	10 ^ -5	2.3 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml
7	18	23	20.5	10 ^ -5	2.1 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml

T 2 - R 3 E. COLI						
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO DE COLONIAS	LOGARITMO
1	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml
3	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml
5	8	15	11.5	10 ^ -5	1.2 X 10 ^ 6 UFC/ml	6 LOG 10 UFC/ml
7	10	14	12	10 ^ -5	1.2 X 10 ^ 6 UFC/ml	6 LOG 10 UFC/ml

T 3 - R 1 LACTOBACILLUS 21 DIAS

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
3	37	42	39.5	10 ⁻⁵	4 X 10 ⁶ UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml
5	20	25	22.5	10 ⁻⁵	2.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml
7	14	18	16	10 ⁻⁵	1.6 X 10 ⁶ UFC/ml	6.2 LOG 10 UFC/ml

T 3 - R 1 E. COLI

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
3	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml
5	10	14	12	10 ⁻⁵	1.2 X 10 ⁶ UFC/ml	6 LOG 10 UFC/ml
7	12	13	12.5	10 ⁻⁵	1.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml

T 3 - R 2 LACTOBACILLUS 21 DIAS

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
2	24	26	25	10 ⁻⁵	2.5 X 10 ⁶ UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml
5	39	39	39	10 ⁻⁵	3.9 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml
6	35	36	35.5	10 ⁻⁵	3.6 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml
7	30	32	31	10 ⁻⁵	3.1 X 10 ⁶ UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml

T 3 - R 2 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
2	10	15	12.5	10 ⁻⁵	1.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml	
5	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
6	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
7	6	11	8.5	10 ⁻⁵	9 X 10 ⁵ UFC/ml	5.9 LOG 10 UFC/ml	

T 3 - R 3 LACTOBACILLUS 21 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
1	38	45	41.5	10 ⁻⁵	4.2 X 10 ⁶ UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml	
2	25	30	27.5	10 ⁻⁵	2.8 X 10 ⁶ UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml	
3	36	40	38	10 ⁻⁵	3.8 X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml	
7	23	25	24	10 ⁻⁵	2.4 X 10 ⁶ UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml	

T 3 - R 3 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO	
1	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
2	10	15	12.5	10 ⁻⁵	1.3 X 10 ⁶ UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml	
3	0	0	0	10 ⁻⁵	0 UFC/ml	0 UFC/ml	
7	10	19	14.5	10 ⁻⁵	1.5 X 10 ⁶ UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml	

T 1 - R 1 LACTOBACILLUS 35 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
1	0	0	0	10 ^ -5		0 UFC/ml	0 UFC/ml
2	0	0	0	10 ^ -5		0 UFC/ml	0 UFC/ml
3	70	78	74	10 ^ -5	7.4 x	10 ^ 6 UFC/ml	6.8 LOG 10 UFC/ml
7	0	0	0	10 ^ -5		0 UFC/ml	0 UFC/ml

T 1 - R 1 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
1	340	325	332.5	10 ^ -5	3.3 X	10 ^ 7 UFC/ml	7.5 LOG 10 UFC/ml
2	100	110	105	10 ^ -5	1 x	10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
3	70	85	77.5	10 ^ -5	7.8 X	10 ^ 6 UFC/ml	6.8 LOG 10 UFC/ml
7	100	110	105	10 ^ -5	1 X	10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml

T 1 - R 2 LACTOBACILLUS 35 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
1	60	49	54.5	10 ^ -5	5.5 X	10 ^ 6 UFC/ml	6.7 LOG 10 UFC/ml
2	25	25	25	10 ^ -5	2.5 X	10 ^ 6 UFC/ml	6.3 LOG 10 UFC/ml
3	48	39	43.5	10 ^ -5	4.4 X	10 ^ 6 UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml


 OS-15-119
 HÉCTOR A. MEJÍA PAICO
 MAYOR S. FVP.

T 1 - R 2 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS		LOGARITMO
1	480	460	470	10 ⁻⁵	4.7	X 10 ⁷ UFC/ml	7.6 LOG 10 UFC/ml
2	100	110	105	10 ⁻⁵	1	X 10 ⁷ UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
3	89	100	94.5	10 ⁻⁵	9.5	X 10 ⁶ UFC/ml	6.9 LOG 10 UFC/ml

T 1 - R 3 LACTOBACILLUS 35 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS		LOGARITMO
2	0	0	0	10 ⁻⁵		0 UFC/ml	0 UFC/ml
3	38	35	36.5	10 ⁻⁵	3.7	X 10 ⁶ UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml
5	38	45	41.5	10 ⁻⁵	4.2	X 10 ⁶ UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml

T 1 - R 3 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS		LOGARITMO
2	400	385	392.5	10 ⁻⁵	3.9	X 10 ⁷ UFC/ml	7.5 LOG 10 UFC/ml
3	370	365	367.5	10 ⁻⁵	3.6	X 10 ⁷ UFC/ml	7.5 LOG 10 UFC/ml
5	180	194	187	10 ⁻⁵	1.8	X 10 ⁷ UFC/ml	7.2 LOG 10 UFC/ml


 CS-20019
 HÉCTORA MEJÍA PAICO
 MAYOR S. INP.

T 2 - R 1 LACTOBACILLUS 35 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
1	120	130	125	10 ^ -5	1.2 X	10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
2	180	180	180	10 ^ -5	1.8 X	10 ^ 7 UFC/ml	7.2 LOG 10 UFC/ml
4	480	486	482.5	10 ^ -5	4.8 X	10 ^ 7 UFC/ml	7.6 LOG 10 UFC/ml
6	100	110	105	10 ^ -5	1 X	10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml

T 2 - R 1 E. COLI							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
1	60	75	67.5	10 ^ -5	6.8 X	10 ^ 6 UFC/ml	6 LOG 10 UFC/ml
2	80	85	82.5	10 ^ -5	8.3 X	10 ^ 6 UFC/ml	6.1 LOG 10 UFC/ml
4	0	0	0	10 ^ -5		0 UFC/ml	0 UFC/ml
6	0	0	0	10 ^ -5		0 UFC/ml	0 UFC/ml

T 2 - R 2 LACTOBACILLUS 35 DIAS							
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO	COLONIAS	LOGARITMO
3	100	105	102.5	10 ^ -5	1 X	10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
4	780	750	765	10 ^ -5	7.6 X	10 ^ 7 UFC/ml	7.8 LOG 10 UFC/ml
6	820	800	810	10 ^ -5	8.1 X	10 ^ 7 UFC/ml	7.9 LOG 10 UFC/ml
7	230	220	225	10 ^ -5	2.2 X	10 ^ 7 UFC/ml	7.3 LOG 10 UFC/ml


 OS-25-10-97
 HÉCTORA MEJÍA PAICO
 MAYOR S. FIRM.

T 2 - R 2 E. COLI

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
3	46	50	48	10 ^ -5	4.8 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml
4	60	75	67.5	10 ^ -5	6.8 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.8 LOG 10 UFC/ml
6	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml
7	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml

T 2 - R 3 LACTOBACILLUS 35 DIAS

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
2	180	186	183	10 ^ -5	1.8 X 10 ^ 7 UFC/ml	7.2 LOG 10 UFC/ml
4	140	145	142.5	10 ^ -5	1.4 X 10 ^ 7 UFC/ml	7.1 LOG 10 UFC/ml
6	250	235	242.5	10 ^ -5	2.4 X 10 ^ 7 UFC/ml	7.3 LOG 10 UFC/ml

T 2 - R 3 E. COLI

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
2	36	40	38	10 ^ -5	3.8 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml
4	60	70	65	10 ^ -5	6.5 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.8 LOG 10 UFC/ml
6	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml

OS 294049
 HÉCTORA MEJÍA PAICO
 MAYORS. PNP.

T 3 - R 1 LACTOBACILLUS 35 DIAS

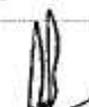
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
1	150	145	147.5	10 ^ -5	1.4 X 10 ^ 7 UFC/ml	7.1 LOG 10 UFC/ml
2	100	130	115	10 ^ -5	1.1 X 10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
4	120	130	125	10 ^ -5	1.2 X 10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
6	184	180	182	10 ^ -5	1.8 X 10 ^ 7 UFC/ml	7.2 LOG 10 UFC/ml

T 3 - R 1 E. COLI

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
1	32	40	36	10 ^ -5	3.6 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.5 LOG 10 UFC/ml
2	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml
4	43	40	41.5	10 ^ -5	4.2 X 10 ^ 6 UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml
6	0	0	0	10 ^ -5	0 UFC/ml	0 UFC/ml

T 3 - R 2 LACTOBACILLUS 35 DIAS

POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
1	120	112	116	10 ^ -5	1.1 X 10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
3	100	125	112.5	10 ^ -5	1.1 X 10 ^ 7 UFC/ml	7 LOG 10 UFC/ml
4	200	208	204	10 ^ -5	2 X 10 ^ 7 UFC/ml	7.3 LOG 10 UFC/ml


 OS-19-019
 HÉCTORA MEJÍA PAICO
 MAYORISTA. PNP.

T 3 - R 2 E. COLI						
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
1	0	0	0	10^{-5}	0 UFC/ml	0 UFC/ml
3	23	30	26.5	10^{-5}	2.7×10^6 UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml
4	0	0	0	10^{-5}	0 UFC/ml	0 UFC/ml

T 3 - R 3 LACTOBACILLUS 35 DIAS						
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
4	166	170	168	10^{-5}	1.6×10^7 UFC/ml	7.2 LOG 10 UFC/ml
5	143	150	146.5	10^{-5}	1.4×10^7 UFC/ml	7.1 LOG 10 UFC/ml
6	190	210	200	10^{-5}	2×10^7 UFC/ml	7.3 LOG 10 UFC/ml

T 3 - R 3 E. COLI						
POLLOS	PLACA 1	PLACA 2	PROMEDIO	F. DILUCION	CONTEO COLONIAS	LOGARITMO
4	40	44	42	10^{-5}	4.2×10^6 UFC/ml	6.6 LOG 10 UFC/ml
5	35	25	30	10^{-5}	3×10^6 UFC/ml	6.4 LOG 10 UFC/ml
6	0	0	0	10^{-5}	0 UFC/ml	0 UFC/ml


 05/20/19
 HÉCTORA MEJÍA FAICG
 MAYOR. FICP.

Apéndice 2: Fichas de registro de la histomorfometría intestinal

IMAGEN	Altura de vellosidad (Hv)	Ancho de vellosidad (Av)	Altura de cripta (Hc)	# vellosidades / 1mm
398 T ₁ R ₁ P ₁	1549.4	105	90.1	9
388 T ₁ R ₁ P ₂	1427.9	84.7	125.3	8
386 T ₁ R ₁ P ₃	1540.2	115.7	110.4	10
435T ₁ R ₁ P ₄	1209.3	71.1	97.1	14
423 T ₁ R ₁ P ₅	1211.3	79.2	99	9
429 T ₁ R ₁ P ₆	1268.2	106.8	94.6	9
385 T ₁ R ₁ P ₇	1222.1	96.3	112.2	10
392 T ₁ R ₂ P ₁	1377.6	118.2	78.6	9
393 T ₁ R ₂ P ₂	1640.1	108.7	105.9	11
397 T ₁ R ₂ P ₃	1716.5	89.6	79.2	10
426 T ₁ R ₂ P ₄	964.6	86.9	81.7	9
410 T ₁ R ₂ P ₅	1037.6	62.4	82.3	13
414 T ₁ R ₂ P ₆	1401.7	75.64	73.9	10
403 T ₁ R ₂ P ₇	1299.5	89	103.5	12
415 T ₁ R ₃ P ₁	897.7	70.98	93.4	11
389 T ₁ R ₃ P ₅	1245.1	106.4	74.9	8
390 T ₁ R ₃ P ₃	1434	115.1	120.4	8
416 T ₁ R ₃ P ₄	1196.4	90.08	139.5	11
434T ₁ R ₃ P ₅	1692.3	126.5	98.1	9
424 T ₁ R ₃ P ₆	1335.8	121	85.8	9
391 T ₁ R ₃ P ₇	1451	109.1	114.3	9

IMAGEN	Altura de vellosidad (Hv)	Ancho de vellosidad (Av)	Altura de cripta (Hc)	# vellosidades / 1mm
352 T ₂ R ₁ P ₁	1487.5	115.5	123.9	6
382 T ₂ R ₁ P ₂	1495.5	98.3	133.2	8
420 T ₂ R ₁ P ₃	1384.1	101.1	140.6	9
360 T ₂ R ₁ P ₄	1047.2	123.2	118.7	7
419 T ₂ R ₁ P ₅	1148.8	99.5	105	10
336 T ₂ R ₁ P ₆	989.7	124.7	130.4	8
417 T ₂ R ₁ P ₇	1226	87.12	54.4	11
425 T ₂ R ₂ P ₁	992.2	85.6	78.3	10
427 T ₂ R ₂ P ₂	1129.2	124.9	115.9	9
383 T ₂ R ₂ P ₃	1619.2	86.3	120.3	10
354 T ₂ R ₂ P ₄	1298.2	136.4	73.9	7
413 T ₂ R ₂ P ₅	1330	77.02	130.6	12
T ₂ R ₂ P ₆	1919.3	114.9	837	9
387 T ₂ R ₂ P ₇	1470.5	127.9	137.1	9
407 T ₂ R ₃ P ₁	1049.8	80.9	91.3	11
395 T ₂ R ₃ P ₂	1558.3	98.9	144	10
402 T ₂ R ₃ P ₃	1454.7	83.8	65.7	13
357 T ₂ R ₃ P ₄	1189.4	137	174.9	6
421 T ₂ R ₃ P ₅	1219.7	115.1	78.9	11
396 T ₂ R ₃ P ₆	1446	70.5	181.9	10
406 T ₂ R ₃ P ₇	1072.9	88.2	134.4	11

IMAGEN	Altura de vellosidad (Hv)	Ancho de vellosidad (Av)	Altura de cripta (Hc)	# vellosidades / 1mm
348 T ₃ R ₁ P ₁	1723.4	108.1	127.6	9
401 T ₃ R ₁ P ₂	1239.6	86.5	95.3	11
422 T ₃ R ₁ P ₃	1276	84.7	51.5	7
394 T ₃ R ₁ P ₄	1666.7	141.1	152.6	8
408 T ₃ R ₁ P ₅	969.3	104.6	105.7	9
335 T ₃ R ₁ P ₆	1677.2	107.9	120	8
400 T ₃ R ₁ P ₇	1067.3	94.8	138.9	10
361 T ₃ R ₂ P ₁	1502.4	105.6	130.6	10
433T3R2P2	1274.8	102.9	112.08	12
358 T ₃ R ₂ P ₃	1717.5	126.2	188.7	8
376 T ₃ R ₂ P ₄	1898	121.6	159.3	7
404 T ₃ R ₂ P ₅	1181.9	88.7	111.2	12
428 T ₃ R ₂ P ₆	1400.5	101.7	111.2	11
399 T ₃ R ₂ P ₇	1230.4	115.5	642.3	9
328 T ₃ R ₂ P ₇	2329.3	159	165.5	9
329 T3 R2 P7	2208.182	122.24	147.942	8
409 T ₃ R ₃ P ₁	1039.7	99.1	119.2	11
412 T ₃ R ₃ P ₂	1265.8	85.12	91	13
405 T ₃ R ₃ P ₃	968.2	96.3	75.2	11
331 T ₃ R ₃ P ₄	1435.7	125.5	169.9	9
384 T ₃ R ₃ P ₅	1407.7	129.5	174.5	9
362 T ₂ R ₃ P ₆	1424.9	117.6	148.6	6
418 T ₃ R ₃ P ₇	1113.3	115.3	105.7	11

Apéndice 3: Evidencias sobre el experimento



Caldo agar Mac Conkey.



Caldo y agar MAN, ROGOSA and SHARPE.



Placas con medio de cultivo.



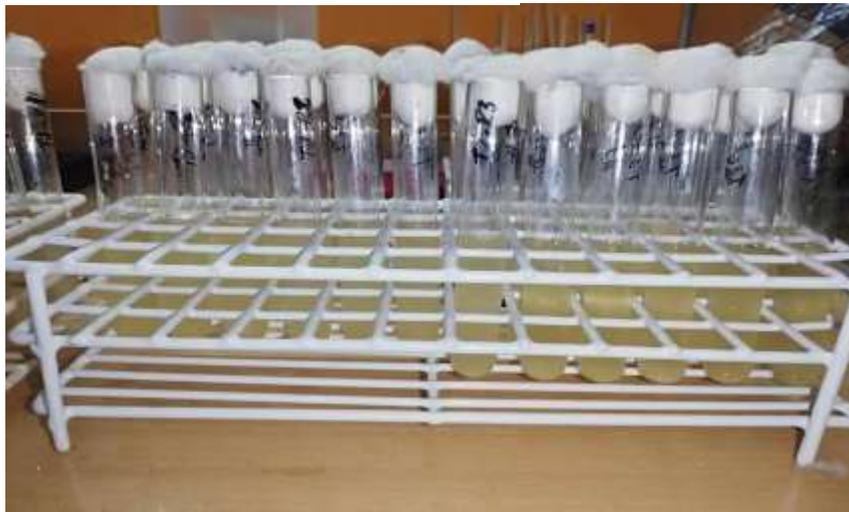
Colonias de *Lactobacillus*.



Diluciones seriadas en tubos de ensayo.



Distribución de los pollitos en su crianza



Caldo de Enriquecimiento



Calidad de Agua: pH y temperatura



Colonias de *lactobacillus*



Láminas histológicas



Diluciones y siembra



Duodeno y páncreas



Preparación de los caldos de enriquecimiento



Medidor de amoníaco ambiental

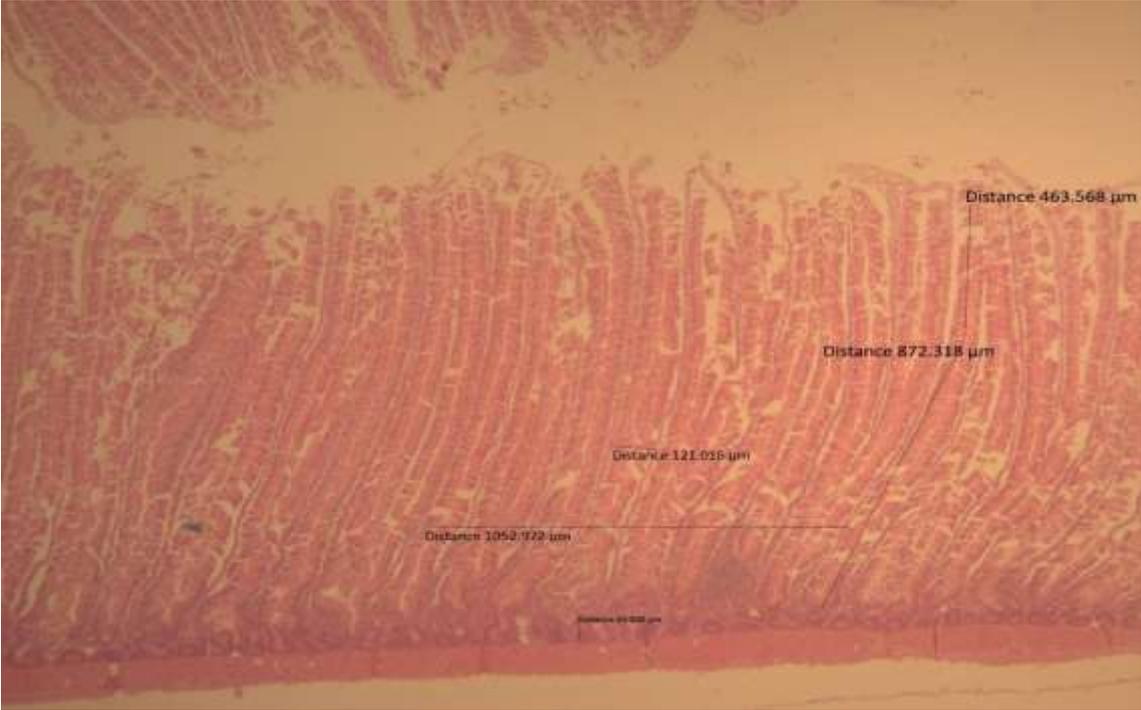


Mesa de necropsia toma de muestra

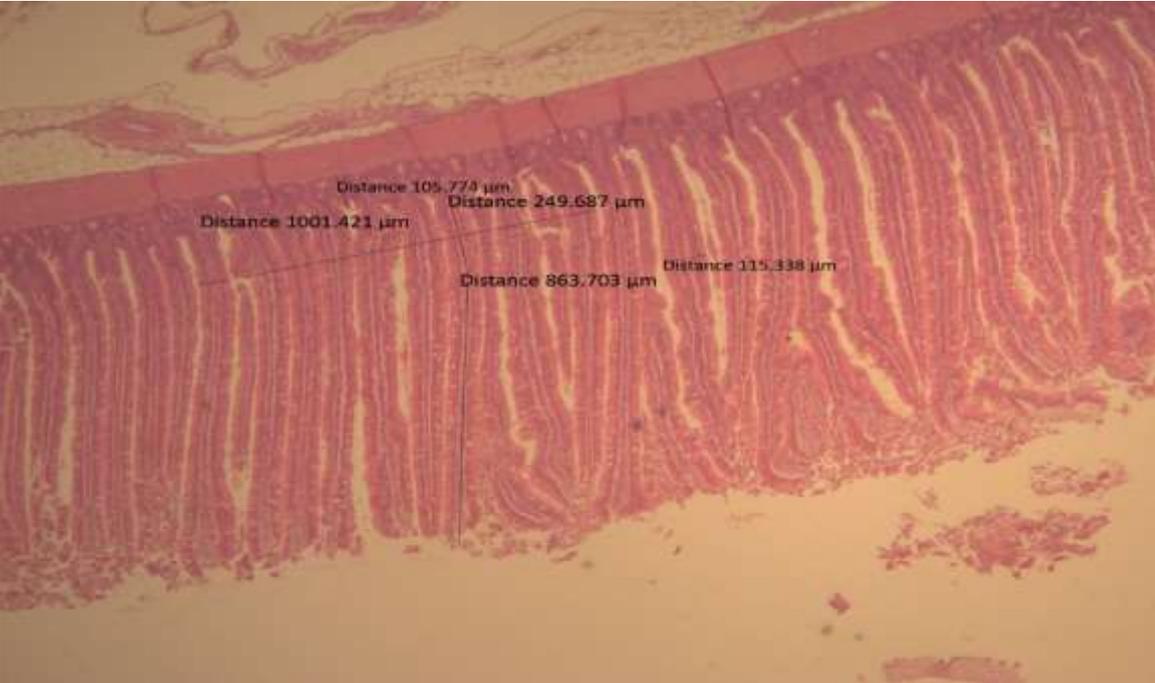


Siembra en agar

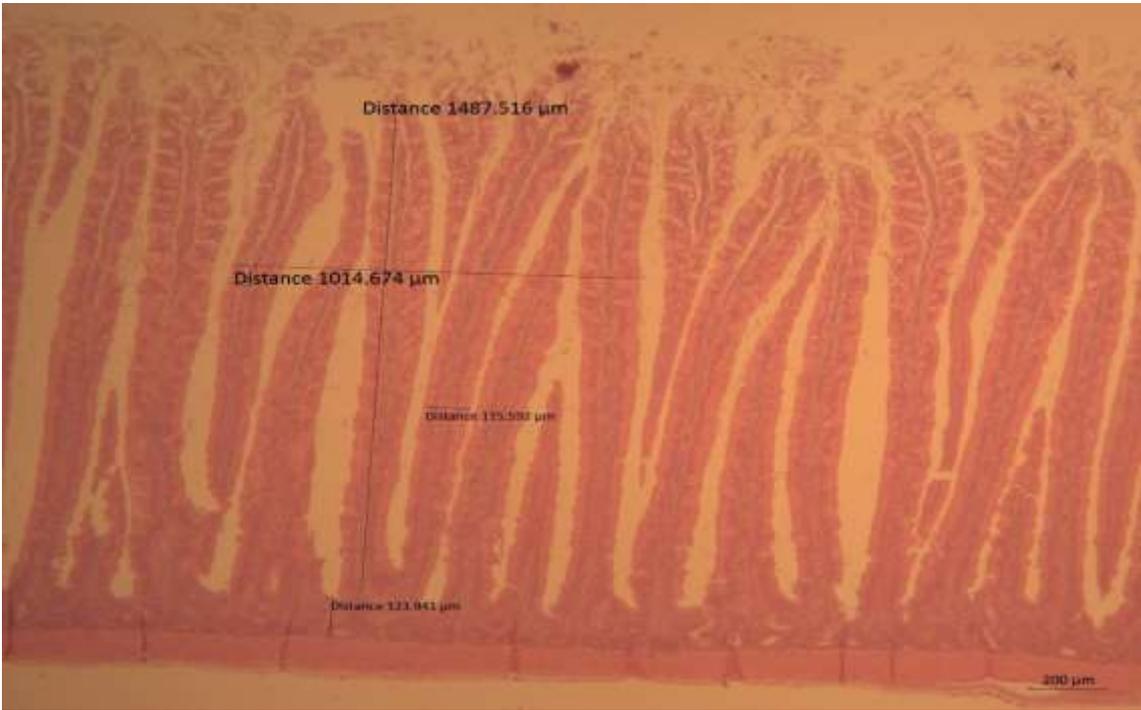
Apéndice 4: Histomorfometría intestinal a los 21 y 35 días



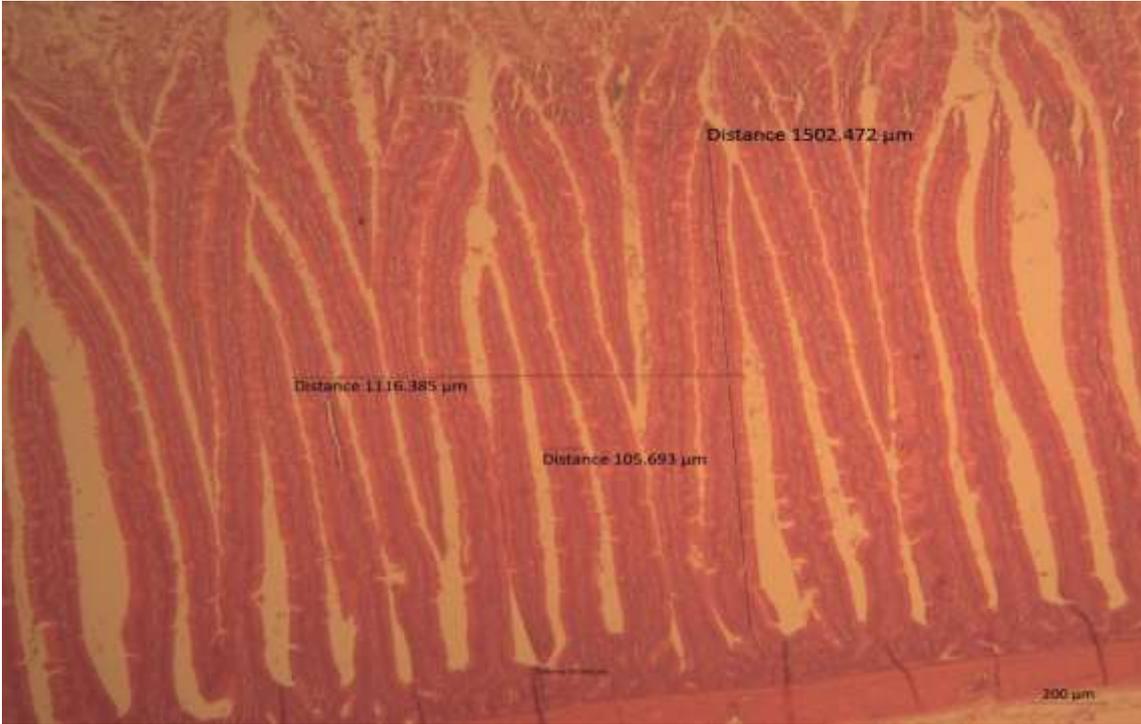
T1 Control 0% acidificante comercial a los 21 días



T3 - 0.2% acidificante comercial a los 21 días de edad.



T₂ - 0.1% acidificante comercial a los 35 días de edad.



T₃ - 0.2% acidificante comercial a los 35 días de edad.

ANEXOS

ANEXO 1. Caldo MRS

HA
MP
F
D

MRS Broth (Lactosebacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE)

Media introduced by DE MAN, ROGOSA and SHARPE (1960) for the enrichment, cultivation and isolation of *Lactobacillus* species from all types of materials.

The medium complies with the German DIN- Norm 10109 and for the inspection of meat and to the regulations acc. to § 35 LMBG (06.00/35) for the inspection of food.

Mode of Action

The MRS culture media contain polysorbate, acetate, magnesium and manganese, which are known to act as special growth factors for lactobacilli, as well as a rich nutrient base. As these media exhibit a very low degree of selectivity, *Pediococcus* and *Leuconostoc* species and other secondary bacteria may grow on them.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 10.0; meat extract 8.0; yeast extract 4.0; D(+)-glucose 20.0; dipotassium hydrogen phosphate 2.0; Tween® 80 1.0; di-ammonium hydrogen citrate 2.0; sodium acetate 5.0; magnesium sulfate 0.2; manganese sulfate 0.04.

Preparation

Suspend 52.2 g MRS Broth/litre, autoclave 15 min at 121°C (or 15 min at 118°C). Autoclavation at 118°C results in better growth of *Bifido bacterium* spp.

pH: 5.7 ± 0.2 at 25 °C.

The broth filled into tubes are clear and brown.

Experimental Procedure and Evaluation

If necessary, homogenize the sample material and then transfer to MRS Broth for enrichment or for determining the bacterial count by the MPN method.

Incubation: up to 3 days at 35 °C or up to 5 days at 30 °C.

Determine the bacterial count. Identify the lactobacilli by the methods proposed by SHARPE (1962) and SHARPE et al. (1966). For further methods of differentiation and identification see ROGOSA et al. (1953), ROGOSA and SHARPE (1959) and DAVIS (1960).

Quality control of MRS Broth

Test strains	Growth
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	good / very good
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	good / very good
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	good / very good
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	good / very good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	fair / good
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	none

Literature

- DAVIS, J.G.: The lactobacilli. – I. *Prog. in Industr. Microbiol.*, **2**, 3 (1960).
- DE MAN, J.D., ROGOSA, M., a. SHARPE, M.E.: A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. – *J. Appl. Bact.*, **23**; 130-136 (1960).
- ROGOSA, M., WISEMAN, R.F., MITCHELL, J.A., DISRAELY, M.N., a. BEAMAN, A.J.: Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellulosus* nov. spec. – *J. Bact.*, **65**; 681-699 (1953).
- Bundesgesundheitsamt: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. – Beuth Verlag Berlin, Köln.
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN 10109.
- ROGOSA, M., a. SHARPE, M.E.: An approach to the classification of the lactobacilli. – *J. Appl. Bact.*, **22**; 329-340 (1959).
- SHARPE, M.E.: Taxonomy of the Lactobacilli. – *Dairy Sci. Abstr.*, **24**; 109 (1962).
- SHARPE, M.E., FRYER, T.F., a. SMITH, D.C.: Identification of the Lactic Acid Bacteria. – In GIBBS, B.M., a. SKINNER, P.A.: Identification Methods for Microbiologists Part A; 65-79 (1966).

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
MRS Broth (Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE)	1.10661.0500	500 g
Anaerobic jar	1.16387.0001	1 ea
Anaeroclip®	1.14226.0001	1 x 25
Anaerocult® C	1.16275.0001	1 x 10
Anaerocult® C mini	1.13682.0001	1 x 25
Plate basket	1.07040.0001	1 ea

ANEXO 2. Agar MRS



www.sigmaaldrich.com

Technical Data Sheet

GranuCult™ MRS Agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) acc. ISO 15214

Ordering number: 1.10660.0500

For isolation, enumeration and cultivation of *Lactobacillus spp.* and other mesophilic lactic acid bacteria from all types of materials.

This culture medium complies with the specifications given by ISO 15214 and APHA.

Mode of Action

This medium contains polysorbate, acetate, magnesium and manganese, which are known to act as special growth factors for *Lactobacilli*, as well as a rich nutrient base. As the medium exhibit a fairly low degree of selectivity, it may support growth of *Pediococcus* and *Leuconostoc* species and other secondary bacteria.

Typical Composition

Specified by ISO 15214		GranuCult™ MRS agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) acc. ISO 15214	
Enzymatic Digest of Casein	10 g/l	Enzymatic Digest of Casein	10 g/l
Meat Extract	10 g/l	Meat Extract	10 g/l
Yeast Extract	4 g/l	Yeast Extract	4 g/l
Glucose	20 g/l	D(+)-Glucose	20 g/l
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2 g/l	Dipotassium Hydrogen Phosphate	2 g/l
Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween® 80)	1.08 g/l	Tween® 80	1.08 g/l
Triammonium Citrate	2 g/l	Di-Ammonium Hydrogen Citrate (equivalent to 2 g/l Triammonium Citrate)	2 g/l
Sodium Acetate	5 g/l	Sodium Acetate	5 g/l
Magnesium Sulfate Heptahydrate	0.2 g/l	Magnesium Sulfate Heptahydrate	0.2 g/l
Manganese Sulfate Tetrahydrate	0.05 g/l	Manganese Sulfate Monohydrate (equivalent to 0.05 g/l Manganese sulfate tetrahydrate)	0.04 g/l
Agar	12- 18 g/l	Agar-Agar*	14 g/l
Water	1000 ml/l	Water	n/a
pH at 25 °C	5.7 ± 0.1**	pH at 25 °C	5.6-5.9

* Agar-Agar is equivalent to other different terms of agar.
 ** ISO 15214 states for the pH: In order that the pH-value does not fall below 5.6, the tolerance here is ± 0.1 instead of ± 0.2 as usual.

Preparation

Dissolve 68.2 g in 1 l of purified water. Heat in boiling water, and agitate frequently until completely dissolved. Autoclave 15 minutes at 121 °C or use 118 °C to achieve improved growth of *Bifidobacterium spp.*

The prepared medium is clear and brown.

Experimental Procedure and Evaluation

Depend on the purpose for which the medium is used.

Following the procedure given by ISO 15214, inoculate the medium by using poured plate technique.

Incubate the inoculated plates inverted at 29-31 °C for 69-75 h.

According to ISO 15214, surface plating in combination with incubation under anaerobic or microaerobic conditions can be applied instead of the pour plating method. Anaerobic or microaerobic conditions can be achieved by using Merck Anaerocult® C or C mini in an anaerobic jar.

It is also possible to use a double-layer MRS.

Avoid desiccation of the agar during incubation so that the medium does not become too inhibitory by increasing the acetate concentration at the surface, which inhibits the growth of *Lactobacilli*.

Storage

Store at +2 °C to +8 °C, dry and tightly closed. Do not use clumped or discolored medium. Protect from UV light (including sun light). For *in vitro* use only.

According to Corry et al., self-prepared plates can be stored +2 °C to + 8 °C in the dark and protected against evaporation for up to 14 days.

Quality Control

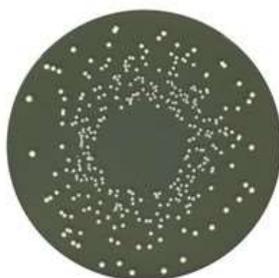
Function	Control strains	Incubation	Reference medium	Method of control	Expected results
Productivity	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC® 4356	69-75 h at 29-31 °C aerobic	Previously validated batch of MRS agar	Quantitative	Recovery ≥ 70 %
	<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC® 15521				
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> ATCC® 19435				
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC® 33316				
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC® 29358				
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC® 11863	69-75 h at 29-31 °C anaerobic	-	Qualitative	Good growth

Function	Control strains	Incubation	Reference medium	Method of control	Expected results
Selectivity	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	69-75 h at 29-31 °C	-	Qualitative	Total inhibition
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922				
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 11778				

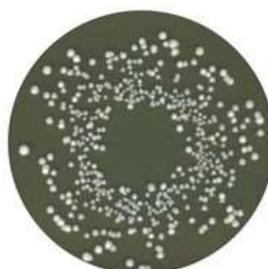
Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis.

The performance test is in accordance with the current version of EN ISO 11133. A

recovery rate of 70 % is equivalent to a productivity value of 0.7.



Lactobacillus casei ATCC® 393



Bifidobacterium bifidum ATCC® 11863

Literature

APHA (2015): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th edition. American Public Health Association, Washington, D.C.

De Man J.D., Rogosa M., and Sharpe M.E. (1960): A Medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* **23**: 130-135.

ISO International Standardisation Organisation. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C. ISO 15214:1998.

ISO International Standardisation Organisation. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. EN ISO 11133:2014.

Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (2012): Culture media for Lactic Acid Bacteria. In: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. (Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. and Baird, R.M. eds.), pp 174-186. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Ordering Information

Product	Cat. No.	Pack size
GranuCult™ MRS Agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) acc. ISO 15214	1.10660.0500	500 g
ReadyPlate™ MRS Medium ISO 15214	1.46717.0020	20 x 90 mm
ReadyPlate™ MRS Medium ISO 15214	1.46717.0100	100 x 90 mm
ReadyTube™ 200 MRS Medium ISO 15214	1.46364.0006	6 x 200 ml
Anaerobic jar	1.16387.0001	1 jar
Anaeroclip®	1.14226.0001	1 x 25
Anaerocult® C	1.16275.0001	1 x 10
Anaerocult® C mini	1.13682.0001	1 x 25
Plate basket	1.07040.0001	1 piece

Merck KGaA
Frankfurter Strasse 250 64293
Darmstadt, Germany Fax: +49
(0) 61 51 / 72-60 80

For more information, visit
www.merckmillipore.com/bimonitoring

Find contact information for your
country at:

www.merckmillipore.com/offices

For Technical Service, please visit:
www.merckmillipore.com/techservice

GranuCult, Merck, Millipore, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2019 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

1.10660.0500

Page 4 of 4

ANEXO 3. Caldo Mac Conkey



Technical Data Sheet

MacConkey Broth acc. harm. EP/USP/JP

Ordering number: 1.05396.0500

MacConkey broth is a selective culture medium used as a presumptive test for *Escherichia coli* and coliform bacteria and for determining the *Escherichia coli* or coliform titre of milk, water and other materials according to MacConkey and Hill (1901).

This medium complies with the specifications given by the harmonized methods of EP, USP, JP for Microbial Examination of Non-sterile Products: Tests for Specified Microorganisms.

Mode of Action

This broth contains lactose which, when degraded, gives acid and gas, according to the definition indicating the presence of *E. coli*. The gas formed is collected in Durham tubes and acid production is detected by the indicator bromocresol purple, which turns yellow. Ox bile promotes the growth of several species of intestinal bacteria and inhibits that of microorganisms, which do not inhabit the intestine.

Typical Composition

Peptone from Gelatine	20 g/l
Lactose	10 g/l
Ox Bile, dired	5 g/l
Bromocresol Purple	0.01 g/l

Preparation

Suspend 35 g/l or more (see Table under Lactose Broth). Fill into test tubes. If desired insert Durham tubes. Autoclave (15 min at 121 °C).

The appearance of the medium is clear and violet.

The pH value at 25 °C is in the range of 7.1-7.5.

Experimental Procedure and Evaluation

See 1.07661. Lactose Broth.

Incubation: 48 h at 30-35 °C.

Merck Millipore is a business of  MERCK

	Microorganisms
Gas and acid are produced	suggests <i>Escherichia coli</i> and possibly other coliform bacteria
Only acid is produced	suggests coliform bacteria without <i>Escherichia coli</i>

Storage

The product can be used for sampling until the expiry date if stored upright, protected from light and properly sealed at +15 °C to +25 °C.

After first opening of the bottle the content can be used up to the expiry date when stored dry and tightly closed at +15 °C to +25 °C.

Disposal

Please mind the respective regulations for the disposal of used culture medium (e.g. autoclave for 20 min at 121 °C, disinfect, incinerate etc.).

Quality Control

Control Strains	ATCC #	Inoculum CFU	Incubation	Expected Results
<i>Escherichia coli</i>	25922	10-100	48 h at 30-35 °C	Good to very good growth, color change to yellow, gas
<i>Escherichia coli</i>	8739	10-100	48 h at 30-35 °C & 24 h at 42-44 °C	Good to very good growth, good to very good growth at 42-44 °C, gas
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	10-100	48 h at 30-35 °C	Good to very good growth, color change to yellow, gas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	10-100	48 h at 30-35 °C	Good to very good growth, color change to yellow, gas
<i>Proteus mirabilis</i>	14273	10-100	48 h at 30-35 °C	Good to very good growth, no color change to yellow, no gas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	10-100	48 h at 30-35 °C	Medium to very good growth, no color change to yellow, no gas
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	≥ 100	48 h at 42-44 °C	No growth at 42-44 °C

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis.



We provide information and advice to our customers on application technologies and regulatory matters to the best of our knowledge and ability, but without obligation or liability. Existing laws and regulations are to be observed in all cases by our customers. This also applies in respect to any rights of third parties. Our information and advice do not relieve our customers of their own responsibility for checking the suitability of our products for the envisaged purpose.

Merck Millipore and the M logo are registered trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Ltd. No. TN1353EN00

Literature

European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. (2014): The European Pharmacopoeia. 8th Ed. Chapter 2.6.13 Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products. Strasbourg, France.

Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. (2011): The Japanese Pharmacopoeia. 16th Ed. Chapter 4.05 Microbial Limit Test II. Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified products. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. Tokyo, Japan.

MacConkey, A. (1905): Lactose-fermenting bacteria in faeces. J. Hyg. 8: 333-379.

MacConkey, A. (1908): Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations. J. Hyg. 8: 322-334.

MacConkey, A. and Hill (1901): Bile salt broth. Thompson Yates Lab. Rep., VI/1; 151 (cited in MacConkey, 1905).

United States Pharmacopoeia 38 NF 33 (2015): <62> Microbiological examination of non-sterile products: Tests for specified microorganisms.

Ordering Information

Product	Cat. No.	Pack size	Other pack sizes available
MacConkey Broth	1.05396.0500	500 g	
Tryptic Soy Broth	1.05459.0500	500 g	5 kg, 25 kg
MacConkey Agar	1.05465.0500	500 g	5 kg
MacConkey Agar - LI 30 ml	1.46022.0020	20 x 90 mm	120 x 90 mm

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Fax: +49 (0) 61 51 / 72-60 80
mibio@merckgroup.com
www.merckmillipore.com/biomonitoring

Find contact information for your country at:
www.merckmillipore.com/offices
For Technical Service, please visit:
www.merckmillipore.com/techservice



We provide information and advice to our customers on application technologies and regulatory matters to the best of our knowledge and ability, but without obligation or liability. Existing laws and regulations are to be observed in all cases by our customers. This also applies in respect to any rights of third parties. Our information and advice do not relieve our customers of their own responsibility for checking the suitability of our products for the envisaged purpose.

Merck Millipore and the M logo are registered trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Lit. No. TN1353EN00

ANEXO 4. Agar Mac Conkey

AC
M
IPF
D
HW

MacCONKEY Agar

Selective agar for the isolation of Salmonella, Shigella and coliform bacteria from faeces, urine, foodstuffs, waste water etc. according to MacCONKEY (1950).

IVD *in vitro* diagnosticum –
For professional use only

See also General Instruction of Use
Warnings and precautions see ChemDAT®
(www.chemdat.info)



The composition of this medium largely complies with the United States Pharmacopeia XXVI (2003) and the European Pharmacopeia II.

Principle

Microbiological method

Mode of Action

Bile salts and crystal violet largely inhibit the growth of the Gram-positive microbial flora. Lactose and the pH indicator neutral red are used to detect lactose degradation.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 17.0; peptone from meat 3.0; sodium chloride 5.0; lactose 10.0; bile salt mixture 1.5; neutral red 0.03; crystal violet 0.001; agar-agar 13.5.

Preparation and StorageCat. No. 1.05465. MacCONKEY Agar (500 g/5 kg)

Usable up to the expiry date when stored dry and tightly closed at +15 to +25° C. Protect from light.

After first opening of the bottle the content can be used up to the expiry date when stored dry and tightly closed at +15 to +25°C.

Suspend 50 g/litre, autoclave (15 min at 121 °C), pour plates.

pH: 7.1 ± 0.2 at 25 °C.

The plates are clear and red-brown to dark red.

Specimen

e.g. Stool, urine.

Clinical specimen collection, handling and processing, see general instructions of use.

Experimental Procedure and Evaluation

Inoculate by spreading the sample material on the surface of the plates.

Incubation: 18–24 hours at 35 °C aerobically.

Lactose-negative colonies are colourless; lactose-positive colonies are red and surrounded by a turbid zone which is due to the precipitation of bile acids as a result of pH decrease.

Appearance of Colonies	Microorganisms
Appearance of Colonies	Microorganisms
Colourless, translucent	Salmonella, Shigella and others
Large, red, surrounded by turbid zone	Escherichia coli
Large, pink, mucoid	Enterobacter, Klebsiella
Very small, opaque, isolated colonies	Enterococci, Staphylococci and others

Literature

European Pharmacopeia II, Chapter VIII, 10.

MacCONKEY, A.: Lactose-fermenting bacteria in faeces. – J. Hyg., 8; 333–379 (1905).

United States Pharmacopeia XXVI, Chapter "Microbiol. Limit Test", 1995.

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
MacCONKEY Agar	1.05465.0500	500 g
MacCONKEY Agar	1.05465.5000	5 kg
Merckoplate* MacCONKEY Agar	1.10748.0001	20 plates
Merckoplate* MacCONKEY Agar	1.15276.0001	480 plates

MacCONKEY Agar

Quality control (spiral plating method)

Test strains	Inoculum (cfu/ml)	Recovery rate (%)	Colour of		Precipitate
			colony	medium	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 *	10 ³ -10 ⁵	≥30	red	red	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	10 ³ -10 ⁵	≥30	colourless	yellowish	-
<i>Salmonella dublin</i> ATCC 15480	10 ³ -10 ⁵	≥30	colourless	yellowish	-
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 11060	10 ³ -10 ⁵	≥30	colourless	yellowish	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	10 ³ -10 ⁵	≥30	colourless	yellowish	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	> 10 ⁵	≤0.01			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	> 10 ⁵	≤0.01			
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	> 10 ⁵	≤0.01			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	> 10 ⁵	≤0.01			
* (at 37 °C and 43-45 °C)					