

AUTORES
AUTHORS

✉ **Marta Laurencio SILVA**
Manuel Pérez QUINTANA
Raúl Píad BARRERAS
Grethel Milián FLORIDO

Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"
Autopista a Varadero. Km 3 ½. Matanzas. Cuba.

Teléfono: 261013; 265670; 265848. Fax: 5-3101

E-mail: marta@cdict.umcc.cu

Ada Iris Marrero y Saúl Amigo Delgado.
Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Aviar.

Autopista a Varadero. Km 1. Matanzas. Cuba.

Teléfono: 261817

RESUMEN

Se evaluó la efectividad de un producto de exclusión competitiva (PEC) sobre la exclusión de patógenos en un experimento con pollos de ceba en un ciclo de 45 días. Se utilizaron cuatro tratamientos en un diseño completamente aleatorizado, estos fueron: Grupo I (control); Grupo II (PEC al día de edad); Grupo III (PEC al primero y al quinto día de edad) y Grupo IV (PEC desde el primero hasta los 45 días). Se determinó la cinética de la población microbiana en el ciego en los siguientes grupos: Staphylococcus, Coliformes, Enterobacteriaceae, Enterococcus, Bacillus, Lactobacillus y Bacterias totales. Los muestreos se realizaron a los 28, 35 y 45 días. Los resultados obtenidos indican que este producto manifestó actividad probiótica sobre indicadores microbiológicos evaluados en el ciego.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los productos considerados con actividad probiótica se encuentran las mezclas de microorganismos autóctonos del tracto digestivo de los animales y el hombre, destacándose por su efectividad, en la mejora de los indicadores productivos, las mezclas indefinidas de bacterias aisladas del tracto gastrointestinal (TGI) de aves libres de patógenos específicos (SPF) o en estado saludable y usadas como productos de exclusión competitiva en este mismo propósito aviar. Estos productos producen sus efectos probióticos, principalmente, por exclusión de microorganismos potencialmente patógenos, el estímulo a la respuesta inmunológica y la prevención de enfermedades infecciosas en animales y el hombre (Rodríguez et al, 1996; Spring et al, 1996; Stanley et al, 1996 y Savage et al, 1996; Bengmark, 1998 y Lucchini et al, 1998).

Existen productos de exclusión competitiva con efecto probiótico, entre los que se destacan el BROILACT, el AVIGARD y el AVIFREE, entre otros, con demostrada eficiencia en las crianzas avícolas. Dichas mezclas están formadas, fundamentalmente, por bacterias ácido lácticas, Bacillus y Bifidobacterias, que son aisladas y desarrolladas en dichas formulaciones.

El costo de alimentación en la crianza del pollo de ceba constituye, aproximadamente, entre el 60 y el 75 % del costo total de producción. Por ello, es necesario la búsqueda de aditivos alimenticios que mejoren la eficiencia de utilización de estos alimentos. Unido a esto, se conoce, que la mortalidad en los animales jóvenes por trastornos diarreicos es muchas veces alta y que esta pudiera reducirse, logrando en los animales recién nacidos un ambiente intestinal donde predominen las bacterias beneficiosas, para que se adhieran y colonicen lo más rápido posible. Una mejora en la composición de la microflora intestinal podría lograrse con el empleo de las microfloras indefinidas de exclusión competitiva, las que impedirían la presencia de patógenos específicos tales como Salmonellas y Coniformes, beneficiarían el desarrollo de una microflora ácido láctica y provocarían una mayor eficiencia en el uso de los alimentos, por estos animales.

El objetivo del presente trabajo fue "evaluar el efecto probiótico de un producto de exclusión competitiva, sobre indicadores microbiológicos en pollos de ceba, obtenido de la microflora intestinal de aves adultas saludables.

2. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 200 pollos de ceba del híbrido comercial HE21 BE43 de un día de edad distribuidas en cuatro grupos experimentales de 50 aves cada uno, según diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos utilizados fueron: Grupo I (control); Grupo II (PEC al día de edad); Grupo III (PEC al primero y al quinto día de edad) y Grupo IV (PEC desde el primero hasta los 45 días).

El sistema de crianza fue en piso con camada de paja de arroz. Se utilizaron 50 pollos por cada tratamiento. El

sistema de alimentación fue *ad libitum*, empleándose un concentrado de inicio de 0 a 28 días, y otro de finalización de 29 a 45 días.

Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple y las diferencias entre medias se determinaron utilizando la dócima de comparación múltiple de Duncan (1955).

2.1 Procedimiento

Se evaluó la actividad probiótica, mezclando ambos cultivos, en un producto de exclusión competitiva sobre el balance microbiano en ciego de pollos de ceba.

Los pollos recibieron tres tipos de concentrados basados en una dieta de maíz-soya, según los requerimientos del NRC (1994). El PEC se preparó en condiciones de laboratorio en zaranda termostataada, en erlenmeyer de 1 000 mL, conteniendo 200 mL de medio de cultivo a base de melazas y sales minerales.

El PEC se mezcló de forma homogénea en el concentrado y se aplicó según tratamientos antes descritos. Los muestreos se hicieron a los 28, 35 y 45 días, donde se sacrificaron 7 aves por tratamientos. Para los indicadores microbiológicos se extrajeron muestras de ciegos y se determinó el número de microorganismos en diferentes medios específicos para el crecimiento de Staphylococcus (Agar-Vogel-Johnson); Coliformes (Agar-Tripton-Bilis), Enterobacteriaceae (Agar-Glucosa-Bilis-Rojo-Violeta), Enterococcus (Agar-Mc Conkey No. 2), Bacillus (Agar-Nutriente), Lactobacillus (MRS) y totales (Agar-Nutriente).

Los conteos microbianos se realizaron según la técnica de las diluciones seriadas y siembra en placas.

3. RESULTADOS

En las figuras 3, 4 y 5 se muestran los resultados del conteo de los principales grupos microbianos, relacionados con la actividad probiótica en el ciego de pollos de ceba ante la aplicación de cuatro dosis del producto de microflora de exclusión competitiva a los 28 días de edad.

En la figura 3 se observa un incremento en los conteos de Staphylococcus, Coliformes y Enterobacteriaceas en el grupo de animal que se utilizó como control. Se destaca la disminución de estos microorganismos en los grupos III y IV.

En la figura 4 existe un aumento en los contenidos de Enterococcus, Bacillus y Lactobacillus en los animales tratados con el producto de exclusión competitiva, con un incremento notable de Lactobacillus en el grupo III.

La figura 5 muestra un aumento en el número de bacterias totales en favor de los animales tratados con el producto, con los mayores valores encontrados en el grupo III.

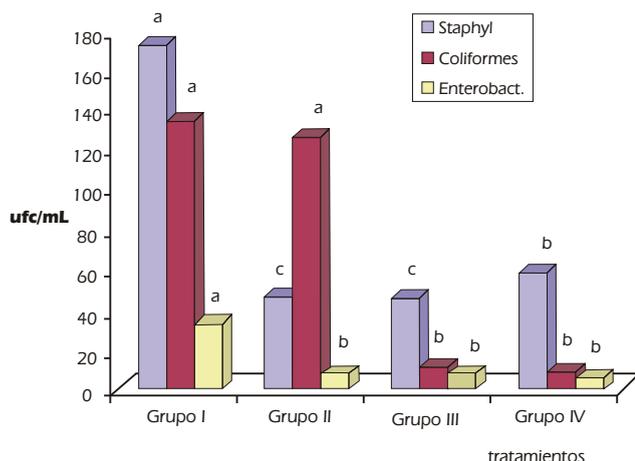


Figura 3. Contenidos de Staphylococcus, Coliformes y Enterobacterias ($\times 10^8$) en el contenido cecal de pollos, de ceba de 28 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva ($P < 0.05$).

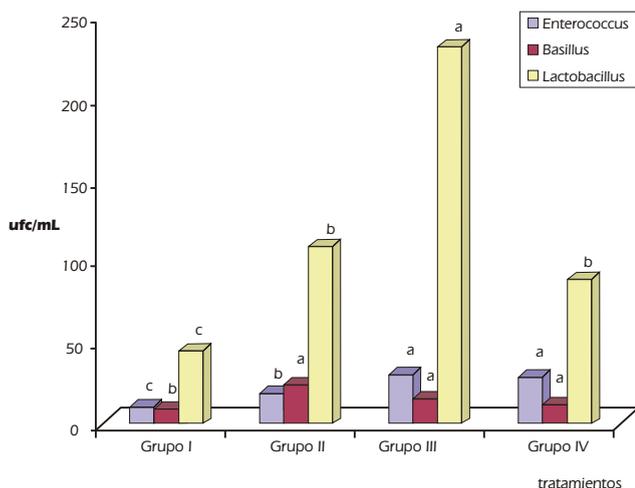


Figura 4. Contenidos de Enterococcus, Bacillus y Lactobacillus ($\times 10^{10}$) en el contenido cecal de pollos de ceba, de 28 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva ($P < 0.05$).

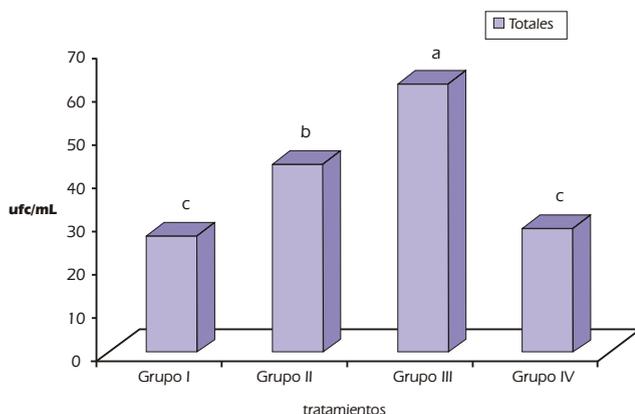


Figura 5. Contenidos de bacterias totales en el contenido cecal ($\times 10^{12}$) de pollos de ceba, de 28 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva ($P < 0.01$).

Las figuras 6, 7 y 8 se muestran los resultados del conteo de los principales grupos microbianos, relacionados con la actividad probiótica en el ciego de pollos de ceba ante la aplicación de cuatro dosis del producto de microflora de exclusión competitiva a los 35 días de edad.

En la figura 6 se presenta un incremento en los conteos de Staphylococcus, Coliformes y Enterobacterias en el grupo de animal que se utilizó como control.

En la figura 7 existe un aumento en los contenidos de Enterococcus, Bacillus y Lactobacillus en los animales tratados con el producto de exclusión competitiva, con un incremento notable en Enterococcus en los grupos II y IV, Bacillus en el grupo IV y de Lactobacillus en los grupo II y III.

En la figura 8 se muestra un aumento en el número de bacterias totales a favor de los animales tratados con el producto de EC.

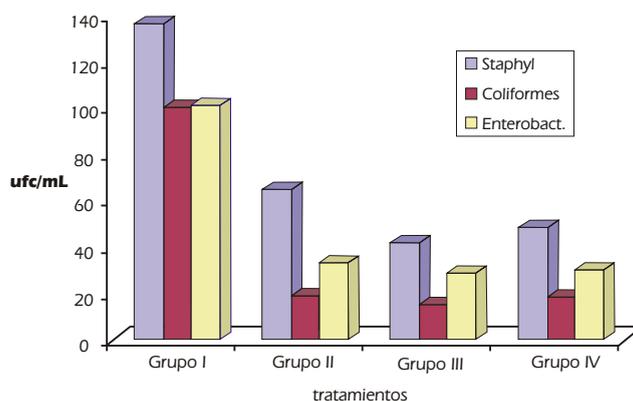


Figura 6. Contenidos de Staphylococcus, Coliformes y Enterobacterias en el contenido cecal ($\times 10^8$) de pollos, de ceba de 35 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva.

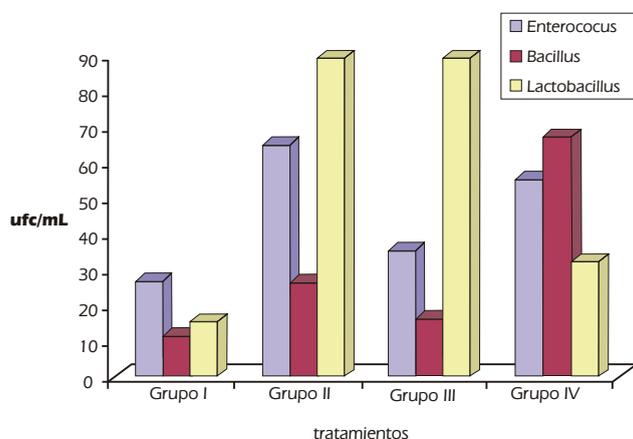


Figura 7. Contenidos de Enterococcus, Bacillus y Lactobacillus en el contenido cecal ($\times 10^{10}$) de pollos de ceba, de 35 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva.

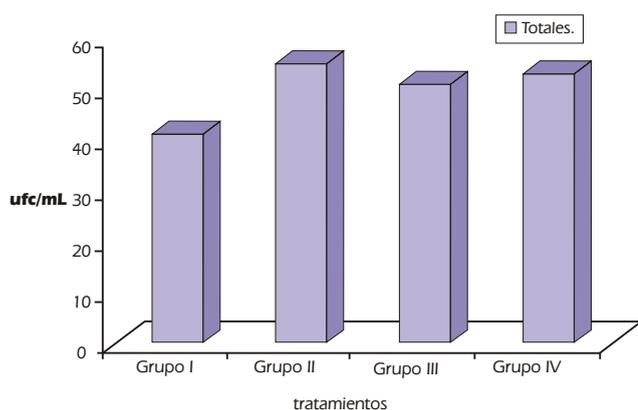


Figura 8. Contenidos de bacterias totales en el contenido cecal ($\times 10^{12}$) de pollos de ceba, de 35 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva.

En las figuras 9, 10 y 11 se muestran los resultados del conteo de los principales grupos microbianos, relacionados con la actividad probiótica en el ciego de pollos de ceba ante la aplicación de cuatro dosis del producto de microflora de exclusión competitiva a los 45 días de edad.

En la figura 9 se presenta un incremento en los conteos, principalmente, de Staphylococcus, Coliformes en el grupo de animal que se utilizó como control. Las Enterobacteriaceas, aunque muestran un incremento, este es muy inferior.

En la figura 10 existe un aumento en los contenidos de Enterococcus, Bacillus y Lactobacillus en los animales tratados con el producto de exclusión competitiva, con un incremento notable en Lactobacillus en el grupo III.

En la figura 11 se muestra un aumento en el número de bacterias totales a favor de los tratados con el producto de CE, con los mayores contenidos en los grupos II y III.

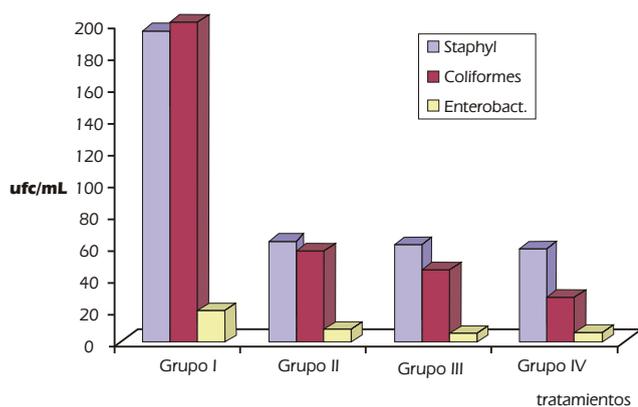


Figura 9. Contenidos de Staphylococcus, Coliformes y Enterobacterias en el contenido cecal ($\times 10^8$) de pollos, de ceba de 45 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva.

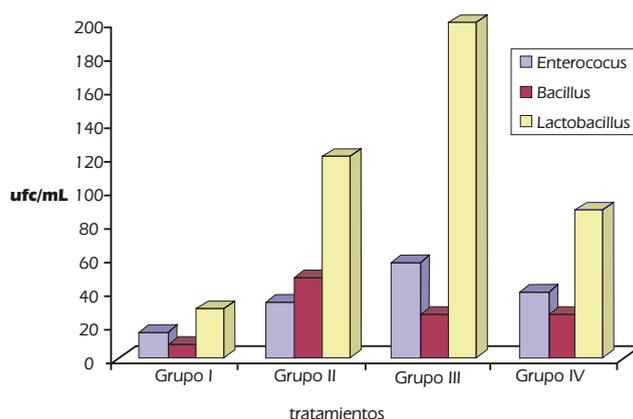


Figura 10. Contenidos de Enterococcus, Bacillus y Lactobacillus en el contenido cecal ($\times 10^{10}$) de pollos de ceba, de 45 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva.

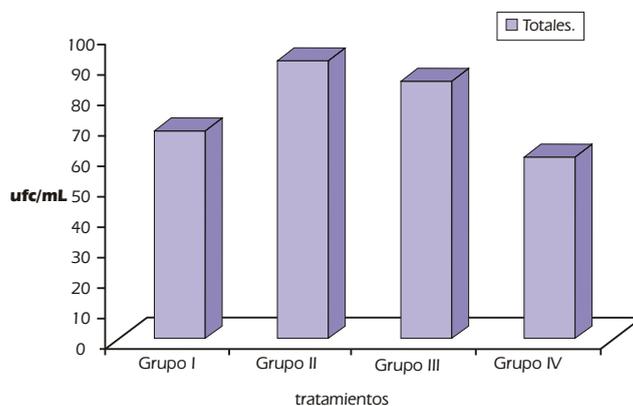


Figura 11. Contenidos de bacterias totales en el contenido cecal ($\times 10^{12}$) de pollos de ceba, de 45 días de edad, ante diferentes tratamientos con microflora de exclusión competitiva.

Nurmi (1973) realizó experimentos donde suministró, a pollitos recién eclosionados, flora intestinal de aves adultas saludables. Como resultado los pollitos tuvieron un rápido establecimiento de su flora, una mejora en la viabilidad, un incremento en el peso corporal y la exclusión de Salmonella, una entidad patógena que causaba fuertes estragos en las parvadas de los productores europeos en aquella época. Este proceso ocurre de forma natural cuando los pollitos reciben de la madre y a través del picoteo, la flora normal de su TGI, pero en las condiciones de crianza moderna, donde los pollitos eclosionan en un medio casi estéril y son ubicados, rápidamente, en granjas con adecuadas condiciones higiénicas, se produce un retraso en el establecimiento de esta microflora beneficiosa, lo que provoca que bacterias patógenas como Salmonella y coliformes puedan establecerse y afectar a las parvadas (Fowler y Mead, 1989). Este concepto fue descrito como "exclusión competitiva" o "el concepto de Nurmi". También se le llamó "efecto de barrera" y se basa en que las bacterias beneficiosas "excluyen", por la rápida colonización del TGI, a las bacterias potencialmente patógenas, ya que estas

cubren la pared intestinal y previenen la intrusión de bacterias dañinas. El primer producto de exclusión competitiva que se utilizó fue el BROILACT que contiene más de 50 tipos de bacterias beneficiosas. En los años 1988, 1989, los brotes de Salmonella enteritidis en el Reino Unido estimularon el uso del BROILACT, introduciéndose en gran escala con éxito (Mulder, 1996 y Vázquez, 1997).

Los mecanismos de la colonización, o la protección, no están todavía respondidos. Sin embargo, la utilización de las microfloras de exclusión competitiva prueba un considerable decrecimiento del rango de contaminación en la vida del ave, tal como ocurre en el presente trabajo (Mulder, 1996).

Impey y Mead (1989) comprobaron la eficacia de un producto de exclusión competitiva al tratar pollos con un cultivo de microorganismos procedentes de los ciegos y posteriormente desafiadas con una cepa de Salmonella typhimurium. A las 48 horas post-inoculación no se observó multiplicación de esta bacteria en los ciegos de los animales tratados, mientras que en las aves testigos los ciegos fueron colonizados con más de 10⁶ Salmonellas/g.

Stavric et al (1992) estudiaron la eficiencia del empleo de flora bacteriana fecal sobre el control del serotipo 0157:H7 de E. coli el cual ha sido asociado con numerosos brotes de colitis hemorrágica en humanos y coloniza, también, a pollitos jóvenes. Para ello fueron tratados pollitos de un día de nacidos con 0.5 ml de cepas fecales (CF) y desafiados oralmente dos días después con 0.5 ml de 10³-10⁹ ufc/ml de E. coli/pollito. Estos fueron sacrificados 6 días después del desafío y los contenidos cecales fueron examinados para E. coli. El efecto protector del CF fue evidente desde el principio hasta el fin pero fue más pronunciado 10 horas después del desafío. De esta manera las medidas de control, como las usadas para Salmonellas presumiblemente por un proceso de exclusión competitiva, serían también útiles para la reducción de la colonización en pollitos con E. coli enteró hemorrágica.

Espinosa (1997) desarrolló ensayos de campo a escala comercial para estudiar el efecto de una microflora indefinida de exclusión competitiva (MEC) con el fin de disminuir las Samonellas asociadas con productos avícolas. Las cepas de MEC fueron aplicadas en dos etapas. El primer tratamiento consistió en rociamiento de las cepas sobre pollitos cuando habían eclosionados del 50 al 75% de éstos. Los pollitos tratados y los controles fueron mantenidos en nacedoras separadas. El segundo tratamiento (secundario) fue aplicado en las casetas proveyendo una dilución de 1: 10 de MEC en bebederos plásticos de 3.8 litros con la primera agua de bebida. Fueron hechas tres comparaciones replicadas en un periodo de 10 meses. Cada caseta tenía una capacidad de 10 000 pollos, una fue usada para la crianza de pollitos tratados y la adyacente para la cría de las aves control (no tratadas). Se tomaron muestras de la nacedora (alimento, agua, camada), estas fueron colectadas antes de colocados los pollitos, después de tres semanas de crecimiento y un día antes del envío de los pollos a la planta de procesamiento. También se obtuvieron muestras de piel, plumas y ciego, esta última extraída de 50 canales / réplicas después del procesamiento e inmediatamente previo al escardamiento de la Planta. La media de la prevalencia de la cáscaras de huevo fue 47% para el control y 50 % para las aves tratadas, lo que indica que el nivel de exposición para la Salmonella en la cabina de la nacedora fue esencialmente el

mismo para los pollitos tratados y los controles.

Según Espinoza (1997) a pesar del aumento de la bioseguridad en la avicultura moderna, todavía resulta difícil el control de padecimientos tan problemáticos como la salmonelosis y la colibacilosis. Estos son, en gran parte, debido al nulo contacto entre madres y progenie, dificultando así la colonización de TGI, proceso que en la actualidad les lleva a las aves, recién nacidas, hasta 3 semanas, período en el cual están en alto riesgo de ser invadidas y colonizadas por bacterias patógenas localizadas en el medio ambiente que les rodea (Salmonella sp y E. coli).

En el presente trabajo se obtuvo un producto de exclusión competitiva (PEC) a partir de la microflora intestinal del ciego de pollos de ceba saludables con el empleo de en un medio de cultivo de bajo costo y reproducible y se alcanzan resultados de mejora en el balance microbiano, en experimento con pollos de cebas cuando se empleó este PEC.

▶ 4. REFERÊNCIAS

- Bengmark S. 1998. Gut microenvironment and immune function. To Current Opinion. February: 20-27.
- Lucchini F, Kmet V., Cesena C., Coppi I., Bottazzi V. y Morelli L. 1998. Specific detection of a probiotic Lactobacillus strain in faecal samples by using multiplex PCR. FEMS Microbiol. Lett. 158 (2): 273-278.
- Rodríguez A., Nardi R., Bambilra E., Vieira E. y Nicoli J. 1996. Effect of Saccharomyces boulardii against experimental oral infection with Salmonella typhimurium and Shigella flexneri in conventional and gnotobiotic mice. J. appl. Bacteriol. 81 (3): 251-256.
- Spring P., Dawson K., Newman K. y Wenks C. 1996. Effect of Mannan Oligosaccharide on Different Cecal Parameters and on Cecal Concentration on Enteric Bacteria in Challenged Broiler Chicks. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. p. 60.
- Stanley V., Gray C. y Hygnius C. 1996. Effect of Mannan Oligosaccharide (BIO-MOS) on Liver and Egg Cholesterol and Tissue Protein Concentration in Chickens. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. p. 61.
- Savage T. y Zakrzewska E. y Pulverer G., 1996. The Effect of Feeding a Mannan Oligosaccharide on Immunoglobulins, Plasma IgG and Bile IgA of Wrolstad MW Male Turkeys. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. P. 148.
- Nurmi E. 1973. New aspect of salmonella infection in broiler production. Nature. London. 41 (3): 210-211.
- Fowler L. G. y Mead G. C. 1990. Competitive exclusion and Salmonella enteritidis. Veterinary Record. 126:489.

Mulder R. 1996. Probiotics and Competitive Exclusion Microflora Against Salmonella. World Poultry. Special. Salmonella. May, p. 30-32.

Vázquez, R. M. 1997. Exclusión competitiva: Nuevo sistema para el control de las enfermedades en las aves. IV Encuentro Latinoamericano de Avicultura. Guadalajara. México.

Impey C. y Mead G. 1989. Fate of salmonellas in the alimentary tract of chicks pre-treated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. J. Appl. Bacteriol. 66 (6): 469-475.

Stavric S., Gleeson E. M., Buchanan B. y Blanchfield B. 1992. Experience of the use of probiotics for salmonella control in poultry. Letters in Applied Microbiology. 14: 69-71.

Espinoza, R. 1997. Parámetros productivos e incidencia de enfermedades bacterianas en reproductoras pesadas tratadas con un producto a base de microflora intestinal. IV Encuentro Latinoamericano de avicultura. Guadalajara. México.