

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**“PEDRO RUIZ GALLO”**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**



**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**MÉDICO VETERINARIO**

**EFECTO DE HARINA DE LA SEMILLA DE MANGO (*Mangifera indica L.*) EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN POLLOS COBB**

**500**

**Investigadores:** Bach. M.V. Bustamante Santa Cruz José Edgar.

Bach. M.V. Garcia Torres Norbil.

**Asesor:** M.Sc. M.V. Edgar Vásquez Sánchez.

**Co-asesor:** M.V. Gianfranco Alberto Chiroque Bravo.

**LAMBAYEQUE – PERÚ, 2019**

**EFFECTO DE HARINA DE LA SEMILLA DE MANGO (*Mangifera indica L.*) EN LA  
MICROBIOTA INTESTINAL EN POLLOS COBB 500.**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO VETERINARIO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Bustamante Santa Cruz José Edgar**

**Bach. Garcia Torres Norbil**

**PRESENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:**

---

**MSc. MV. Cesar Augusto Piscoya Vargas  
PRESIDENTE**

---

**M.V. Cesar Morante Chavarry  
SECRETARIO**

---

**MV. Adriano Natividad Castañeda Larrea  
VOCAL**

---

**MV. MSc. Edgar Vásquez Sánchez  
ASESOR**

---

**M.V. Gianfranco Alberto Chiroque Bravo  
CO-ASESOR**

## **DEDICATORIA**

A mi padre por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. A mi madre, a pesar de nuestra distancia física, siento que éstas conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como es para mí.

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

**(Bustamante Santa Cruz José Edgar)**

A mis padres por el apoyo durante toda esta etapa académica, que con su esfuerzo y sacrificio hicieron que me supere cada día más, brindándome consejos, buscando lo mejor para mí y así poder lograr este objetivo.

**(Garcia Torres Norbil)**

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Edgar Vásquez Sánchez, nuestro asesor y a Gianfranco Alberto Chiroque Bravo Co-asesor en esta investigación; por ser nuestra gran guía, maestros y sobre todo amigos, que supieron enrumbarnos correctamente a la culminación de este trabajo.

A todos los que contribuyeron a una correcta formación en nuestra vida personal y profesional, gracias a todos por sus conocimientos compartidos, buenos consejos y motivación constante.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
ÍNDICE .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1. ANTECEDENTES.....	4
2.2. BASE TEÓRICA.....	5
2.2.1 Microbiota del tracto gastrointestinal en aves.....	5
2.2.2. Composición de la microbiota intestinal del ave. ....	14
2.2.2.2. Microbiota en aves, según órganos del TGI.....	19
2.2.3. Mango ( <i>Mangífera indica</i> L.).....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. MATERIALES .....	32
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	32
3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO .....	32
3.2. DISEÑO METODOLÓGICO .....	33
3.2.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA .....	33
3.2.2. Adecuación del galpón.....	34
3.2.3. Procesamiento de semilla de mango .....	34
3.2.4. Análisis bromatológico de harina de semilla de mango .....	36
3.2.5. Alimentación .....	36
3.2.6. Necropsia.....	36
3.2.7. Análisis de las muestras.....	38
➤ <i>Para Lactobacillus spp.</i> .....	48
3.3. MÉTODO ESTADÍSTICO .....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	55
4.2. <i>Lactobacillus spp</i> .....	58
V. CONCLUSIONES.....	64
VI. RECOMENDACIONES .....	65
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
VIII. ANEXOS .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la microbiota en el íleon y ciego en pollos.....	22
<b>Tabla 2.</b> Composición proximal de harina de semilla de mango (HSM), maíz y granos de sorgo (g / 100 g de MS).....	23
<b>Tabla 3.</b> Perfil de aminoácidos esenciales de harina de semilla de mango (MSK), maíz, granos de sorgo y harina de soya.....	24
<b>Tabla 4.</b> Comparación de la actividad antimicrobiana (MIC) de la HSM y los polifenoles.....	28
<b>Tabla 5.</b> <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de mango en el día 7.....	55
<b>Tabla 6.</b> <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 23.....	56
<b>Tabla 7.</b> <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 42.....	57
<b>Tabla 8.</b> <i>Lactobacillus</i> spp ( $10^5$ UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 7.....	58
<b>Tabla 9.</b> <i>Lactobacillus</i> spp ( $10^5$ UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 23.....	59
<b>Tabla 10.</b> <i>Lactobacillus</i> spp( $10^5$ UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 42.....	60
<b>Tabla 11.</b> <i>Lactobacillus</i> spp ( $10^5$ UFC/g) y <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en el intestino delgado de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM).....	61
<b>Tabla 12.</b> <i>Lactobacillus</i> spp ( $10^5$ UFC/g) y <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en el intestino grueso de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM).....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del ecosistema intestinal .....	6
<b>Figura 2.</b> Microbiota más abundante en el tracto gastrointestinal (TGI). .....	21
<b>Figura 3.</b> Mapa satelital del lugar de estudio: Túcume – Lambayeque .....	33
<b>Figura 4.</b> Instalación del galpón experimental.....	34
<b>Figura 5.</b> Proceso de hervido en semillas de mango.....	35
<b>Figura 6.</b> Almacenaje y secado de semillas de mango.....	35
<b>Figura 7.</b> Molienda de semilla de mango.....	36
<b>Figura 8.</b> Necropsia de los pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de Harina de semilla de Mango (HSM).....	38
<b>Figura 9.</b> Separación de los segmentos intestinales de los pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de Harina de semilla de Mango (HSM).....	38
<b>Figura 10.</b> Esterilización del material para la preparación de los medios de cultivo bacteriano.....	39
<b>Figura 11.</b> Pesado de segmentos intestinales.....	40
<b>Figura 12.</b> Diluciones $10^{-1}$ ml de agua peptonada .....	40
<b>Figura 13.</b> Extracción de las diluciones en los tubos de ensayo.....	40
<b>Figura 14.</b> Preparación del Agar TBX: Cromogenico spp.....	41
<b>Figura 15.</b> Preparación del Agar MRS:Lactobacillus spp.....	42
<b>Figura 16.</b> Siembra de <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus</i> spp.....	46
<b>Figura 17.</b> Incubación de <i>Escherichia coli</i> .....	46
<b>Figura 18.</b> Recuento de colonias de <i>E. coli</i> del contenido intestinal de pollos Coob.500 en agar cromogénico TBX.....	47
<b>Figura 19.</b> Lectura de placas de <i>E. coli</i> .....	47

<b>Figura 20.</b> Recuento de colonias del contenido intestinal de pollos Coob.500 en agar Man Rogosa (M.R.S.) .....	48
<b>Figura 21.</b> Lectura de <i>E. coli</i> en TSI.....	49
<b>Figura 22.</b> Prueba de identificación LIA (Lisina +).....	50
<b>Figura 23.</b> Citrato de Simmons: Citrato -.....	51
<b>Figura 24.</b> Lectura de Caldo Glucosado.....	51
<b>Figura 25.</b> Prueba del Indol.....	52
<b>Figura 26.</b> Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp.....	53
<b>Figura 27.</b> <i>Lactobacillus</i> spp ( $10^5$ UFC/g) y <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en el tracto gastrointestinal (intestino delgado y grueso) de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM) .....	62
<b>Figura 28.</b> Comportamiento de <i>Lactobacillus</i> spp ( $10^5$ UFC/g) y <i>Escherichia coli</i> ( $10^4$ UFC/g) en el tracto gastrointestinal (intestino delgado y grueso) de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM) .....	63

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la harina de semilla de mango (*Mangifera indica L.*) en la microbiota intestinal en pollos Cobb 500 en un galpón experimental ubicado en el distrito de Túcume – Lambayeque, Perú. Para tal estudio se emplearon 336 pollos de la línea Cobb 500 alimentados con harina de semillas de mango (HSM), distribuidos en cuatro grupos de 84 pollos cada uno: T0= 0% de HSM, T1=10% HSM, T2=25% HSM, T3=50% HSM. Los pollos fueron sacrificados en los días 7 (inicio), 23 (crecimiento) y 42 (engorde), y se separó los segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), grueso (ciego y colon). Luego se procedió a la preparación de medios de cultivos como: Agar peptona para el aislamiento de *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp, para su crecimiento Agar Triptona Bilis X-Glucoronida (TBX) Cromogénico y Agar Man Rogosa y Sharpe (MRS) respectivamente, realizándose el conteo de colonias en las placas Petri; además pruebas bioquímicas (TSI, LIA, agar citrato de Simmons, caldo glucosado, prueba indol) para su identificación; encontrándose que la población de *Escherichia coli* disminuyó ( $p<0.01$ ) en el grupo de pollos alimentados el 25% HSM en los días 7; 23 y 42 evidenciando su efecto antimicrobiano en los segmentos intestinales; de igual manera el mismo grupo se observó un aumento ( $p<0.01$ ) de la población de *Lactobacillus* spp. observándose que el aumento de la población de *Lactobacillus* spp. tuvo un efecto antagónico con respecto a la población microbiana de *Escherichia coli*.

Palabras clave: Harina de semilla de mango, pollos Cobb 500, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp.

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate the effect of mango flour (*Mangifera indica* L.) on the intestinal microbiota in Cobb 500 chickens in an experimental shed located in the district of Túcume - Lambayeque, Peru; from December 2018 to February 2019. The mango seeds were stored and dried without any treatment, and then subjected to milling (hammer mill) and stored at room temperature. For this study, 336 chickens of the Cobb 500 line were fed with mango seed flour (HSM), distributed in four groups of 84 chickens each: T0 = 0% of HSM, T1 = 10% HSM, T2 = 25% HSM, T3 = 50% HSM. The chickens were sacrificed on days 7 (Start), 23 (Growth) and 42 (Fattening) in the Veterinary Physiology laboratory of the UNPRG, and separated the segments of the small intestine (duodenum, jejunum, ileum), thick (Blind) and colon). Then we proceeded to the preparation of culture media such as: Peptone agar for the isolation of *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp*, for growth Agar Trypton Bile X-Glucoronide (TBX) Chromogenic and Agar Man Rogosa and Sharpe (MRS) respectively, the counting of colonies in Petri dishes; also biochemical tests (TSI, LIA, Simmons citrate agar, glucosed broth, indole test) for identification; finding that the population of *Escherichia coli* decreased ( $p < 0.01$ ) in the group of chickens fed 25% HSM on days 7; 23 and 42 evidencing its antimicrobial effect in the intestinal segments; In the same way, the same group observed an increase ( $p < 0.01$ ) in the population of *Lactobacillus spp*. observing that the population increase of *Lactobacillus spp*. had an antagonistic effect with respect to the microbial population of *Escherichia coli*.

**Key words:** Mango seed meal, Cobb 500 chickens, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp*.

## I. INTRODUCCIÓN

La actividad de la industria avícola está destinada principalmente a la producción de huevos y carne por lo que en los últimos tiempos, muchos países en desarrollo han optado por la producción avícola intensiva donde el alimento es un factor de importancia que constituye el mayor costo en el proceso productivo, representando entre el 65% al 70% de los costos de producción<sup>(1)</sup>. Asimismo, el alimento también se convierte en un elemento que expone a las aves a una amplia variedad de factores a través del tracto gastrointestinal, por lo que es trascendental mantener la salud intestinal que permita que se alcance un máximo rendimiento con el mínimo costo<sup>(2)</sup>.

Al decir de autores como Savory y Wagner and Thomas citado por Apajalahti J.<sup>(3)</sup>, la microbiota intestinal es una parte integral del sistema digestivo de todos los animales, permitiendo el catabolismo y facilitando la captación de energía indispensable para su metabolismo celular, entendiendo que las especies bacterianas difieren en relación a sus preferencias de sustratos y a sus necesidades para el crecimiento, donde la composición química y la estructura de la digesta determinan ampliamente la distribución de la comunidad microbiana en el tracto intestinal, siendo los cambios en la composición de la dieta o en la densidad de nutrientes determinantes sobre la población microbiana intestinal lo que a su vez influye en la habilidad de los animales para digerir y absorber nutrientes<sup>(4,5)</sup>.

Investigaciones señalan el efecto de los antibióticos promotores de crecimiento (APC) en pollos, reportan mejoras significativas en los rendimientos productivos<sup>(6)</sup>. A pesar de los resultados, la Unión Europea (UE) tomó la decisión de prohibir su uso en alimentación animal a partir del 1 de enero de 2006, debido a la posibilidad de generación de resistencias a patógenos de los antibióticos y a las consecuencias negativas sobre la salud y el bienestar animal y la seguridad alimentaria<sup>(7)</sup>; es por eso la búsqueda de alimentos de origen vegetal con propiedades antibacterianas para el reemplazo de los antibióticos promotores de crecimiento, siendo una alternativa la semilla de mango como sustituto, entendiéndose que estudios acerca de su composición química, reportan que es una fuente de carbohidratos (58-80%), contiene cantidades moderadas de proteínas (6-13%) y grasa (6-16%). La proteína de semilla de mango tiene un buen perfil de aminoácidos esenciales y su aceite es una buena fuente de ácidos esteárico (24-57%), oleico (34-56%) y linoleico.<sup>(8)</sup> Además su capacidad antibacteriana de SM se le atribuye a compuestos fenólicos, como la galanginina, cuyo mecanismo de acción inhibe el ADN girasa de células bacterianas, además de inhibir la enzima topoisomerasa IV<sup>(9)</sup>. Otros investigadores como Denny *et al.*,<sup>(10)</sup> observaron actividad frente a las beta lactamasas, estas actividades no pueden atribuirse a la presencia de una sola molécula del fruto, sino a la acción de los compuestos de carácter fenólico que ejercen efectos sinérgicos, formando un fitocomplejo activo en la inhibición microbiana.

Ante lo expuesto y teniendo en consideración que la semilla de mango, residuo orgánico por las agroindustrias que no son aprovechados eficientemente, se pueden incluir en la dieta de los animales debido a su valor nutricional y además de su poder antibacteriano<sup>(11)</sup>.

En base a estos antecedentes la presente investigación tiene como objetivos:

- Evaluar el efecto de harina de la semilla de mango (*Mangifera indica L.*) en la microbiota intestinal de los pollos Cobb 500.

- Cuantificar la población de *Escherichia. coli*, en el intestino delgado (porción duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (porción colon y ciego) en pollos Cobb 500 alimentados con harina de la semilla de mango (*Mangifera indica L.*).
- Cuantificar la población de *Lactobacillus spp*, en el intestino delgado (porción duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (porción colon y ciego) en pollos Cobb 500 alimentados con harina de la semilla de mango (*Mangifera indica L.*).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES.

Ravindran and Sivakanesan<sup>(12)</sup> evaluaron el valor nutritivo de los granos de semillas de mango crudo (*Mangifera indica L*) el cual contenían taninos (56.5 g kg<sup>-1</sup> de MS), glucósidos cianogénicos (64 mg kg<sup>-1</sup> de MS), oxalatos (42 mg kg<sup>-1</sup> de MS) y actividad inhibidora de la tripsina ( 20 TIU g<sup>-1</sup> DM). Reduciendo sus factores anti nutritivos mediante los tratamientos de remojo y ebullición, manifestando que la ebullición fue más efectiva.

Moreno<sup>(13)</sup> evaluó la composición fisicoquímica de una harina integral elaborada a partir de los cotiledones de *Mangifera indica L*. variedad bocado, cosechados en el estado Carabobo –Venezuela, estos cotiledones obtenidos se sometieron a secado parcial hasta alcanzar una humedad de 8,00% y posteriormente fueron molidos. Evaluados mediante las normas A.O.A.C. (1980) encontraron: humedad (9,61%), grasa bruta (3, 12%), fibra (2 ,68%), cenizas (2,64%), ELN (65 ,61%), proteína (6. 9%), calcio (0, 14%), fósforo (0,090/o) y taninos (7,75%). El bajo valor de fibra permite la utilización de la harina integral para consumo animal.

Diarra *et al.*,<sup>(14)</sup> investigaron el valor de la harina de mango hervida usando 225 pollos de engorde Anak-2000 de un día a 63 días de edad, empleando dietas (iniciador y finalizador) que contenían 0, 25, 50, 75 y 100% de harina de mango hervida (100°C durante 30 min) como sustituto del maíz en las dietas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Obteniendo una reducción significativa (87,26%) de tanino por ebullición. Mostrando que el crecimiento del pollo (ganancia diaria y relación de conversión alimenticia) se redujo cuando la inclusión excedió el 50% durante la fase de finalización; manifestando la depresión del crecimiento se observó solo por encima del 75% de reemplazo del maíz. Los autores recomiendan que la harina de mango hervida puede reemplazar al 50% de maíz en la dieta de pollos de engorde y hasta el 75% en las dietas de finalización.

Amao *et al.*,<sup>(15)</sup> examinó el reemplazo del grano de mango tratado con calor seco a diferentes niveles (0, 10, 20 y 30%) en la dieta de 120 aves de pollos las aves fueron asignadas a cuatro tratamientos y replicado 3 veces con 10 aves cada uno, fueron alimentados ad libitum. La proteína total y la albúmina fueron significativamente altas ( $p < 0.05$ ) en aves alimentadas con 10% de grano de mango tratado térmicamente; la urea fue significativamente alta en aves alimentadas con 10 y 20% de semillas de mango tratadas térmicamente. La alanina transaminasa (ALT) también muestra una gran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en aves alimentadas con un 30% de semillas de mango tratadas térmicamente, pero todos los valores se encuentran dentro del rango normal para pollos de engorde. Este estudio revela que el grano de mango tratado con calor seco puede usarse en la dieta de pollos de engorde hasta en un 30% de reemplazo de maíz sin ningún efecto adverso.

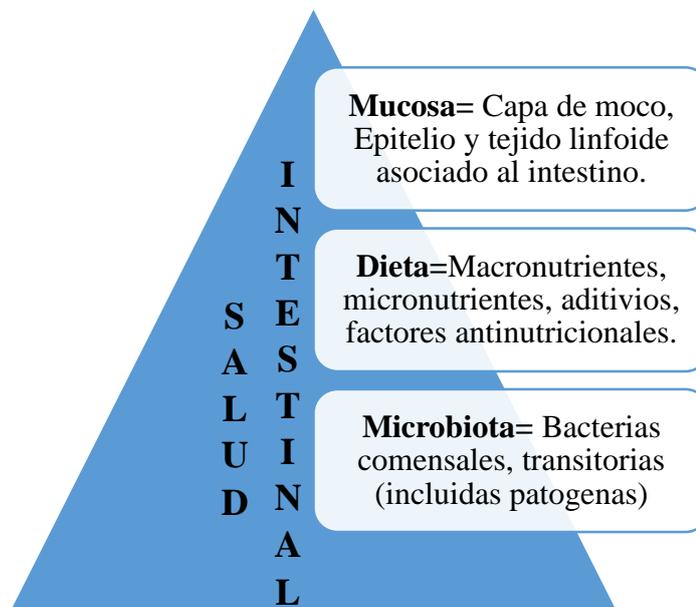
## **2.2. BASE TEÓRICA.**

### **2.2.1 Microbiota del tracto gastrointestinal en aves**

La microbiota intestinal es parte importante del tracto gastrointestinal (TGI) debido a que contribuye al bienestar del huésped animal en una variedad de aspectos, tanto en la nutrición como la resistencia a enfermedades <sup>(16)</sup>.

En Europa las exigencias de las políticas han permitido realizar investigaciones a buscar alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento (APC), desde un punto de vista más integral buscando la “salud intestinal”; dependiendo del equilibrio de tres factores principales: dieta, mucosa (huésped) y microbiota <sup>(17)</sup> (figura 1).

Figura 1. Representación esquemática del ecosistema intestinal



Fuente: Modificado de Conway<sup>(17)</sup>

A medida que el huésped crece, la microbiota del TGI se vuelve muy diversa hasta que alcanza un estado relativamente estable pero dinámico<sup>(16)</sup>; ya que el TGI es un sistema complejo, constituido por el alimento ingerido, sus constituyentes y contaminantes; la población microbiana residente y transitoria, los nutrientes endógenos y secreciones y los órganos accesorios como: hígado, vesícula biliar y páncreas<sup>(18)</sup>. El componente más importante del TGI es la población de microorganismos, la cual representa entre el 1 y 2% del peso corporal<sup>(19)</sup>.

En el TGI de los animales y el hombre, formado bacterias aproximadamente más de  $10^{14}$  UFC en total<sup>(20,21,22)</sup>; conviviendo con levaduras, archeas, protozoos, hongos y bacteriófagos<sup>(23)</sup>. La microbiota intestinal tiene una relación de simbiosis con el animal que habita, regulando multitud de procesos como la eficiencia de absorción de

nutrientes, el tiempo de residencia en el TGI del bolo alimenticio, la utilización de nutrientes, la maduración intestinal o la modulación del sistema inmune<sup>(24,25)</sup>, así como también crea una barrera defensiva frente a patógenos<sup>(26,27,28)</sup>. De acuerdo con Lunedo *et al.*,<sup>(29)</sup> existen dos lugares importantes donde habitan las bacterias intestinales con funciones diferenciadas: la mucosa y los contenidos del lumen. Las primeras tienen una clara influencia sobre la estructura funcionalidad de la mucosa; y las segundas intervienen en la digestión de nutrientes e hidrólisis de compuestos y proporcionan nutrientes para la comunidad bacteriana propia y para el animal que la hospeda.

Se ha observado que los primeros colonizadores a nivel microbiano pertenecen por lo general a la familia Enterobacteriaceae seguidos de cerca por bacterias del género *Clostridium* y *Lactobacillus* claramente representativos<sup>(30,31)</sup>.

La microflora del TGI está constituida por una diversa población compuesta principalmente por bacterias. Estas poblaciones pueden ser caracterizadas como patógenas y benéficas, sobresaliendo entre los patógenos el *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp y *Escherichia coli*, los cuales están involucrados en la inducción de la infección y producción de toxinas, reduciendo el comportamiento productivo del pollo de engorde<sup>(32)</sup>. Los dos grupos invaden todos los sitios del intestino delgado, aunque se sitúan más en la parte proximal que en la distal. El primer sitio de invasión son las tonsilas cecales y luego causan una rápida inflamación de la mucosa intestinal. En cuanto a *E. Coli*, la colonización del intestino por esta bacteria, está asociada a factores de estrés, mal manejo de temperatura y ayuno, entre otros<sup>(33)</sup>. Por el contrario, las poblaciones de bacterias benéficas está representada fundamentalmente por *Lactobacillus* y Bífidobacterias, y tiene un papel en la nutrición, detoxificación de ciertos compuestos, crecimiento y protección contra bacterias patógenas, influyendo directamente en la salud y bienestar del hospedero<sup>(24)</sup>.

### 2.2.1.1 Bacterias patógenas en el TGI en aves

Collett<sup>(34)</sup> describe tres mecanismos específicos que causan la enfermedad en el TGI: primero, organismos enterotoxigénicos como el *Clostridium perfringens* generan compuestos tóxicos como producto del catabolismo de aminoácidos, entre los que se encuentran el amonio, fenoles, índoles y aminas como histamina y cadaverina<sup>(35)</sup>, toxinas que causan un recambio celular en el epitelio intestinal, explicando su efecto sobre el grosor de la pared intestinal y la muerte celular<sup>(36)</sup>. Segundo, organismos enteroinvasivos como la *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* que invaden la barrera flora-huésped, estimulando en las células epiteliales una endocitosis e iniciando la liberación de citoquinas que causan muerte celular. Tercero, organismos enteropatógenos que causan lesiones, destrucción de las microvellosidades y destrucción de la barrera bacteria - huésped o del citoesqueleto. De otra parte, algunas bacterias en el TGI promueven una desconjugación de los ácidos biliares, con la consecuente reducción de la digestión de las grasas y bajas tasas de crecimiento de los pollos. La mayor severidad se ha observado en el *Streptococcus faecium* y *Clostridium perfringens*<sup>(37)</sup>. En particular, el *Clostridium perfringens* es el agente etiológico de la enteritis necrótica, que se manifiesta por un bajo consumo de alimento, limitado crecimiento, diarrea y severa necrosis del TGI. El incremento en la secreción de mucina, unido a una alta tasa de recambio celular, genera alta tasa de metabolismo y síntesis de proteína, resultando en gasto que se estima entre el 23-36% de la energía corporal consumida y de pérdidas endógenas de proteína<sup>(38)</sup>.

La reducción de las bacterias totales por efecto de los APC ya sea sintéticos o naturales conducen a disminución de la actividad del sistema inmune intestinal, lo cual libera energía para procesos metabólicos relacionados con el crecimiento<sup>(39)</sup>.

En consecuencia, el uso de APC permite obtener mayor disponibilidad de nutrientes, principalmente de energía y aminoácidos<sup>(40)</sup>.

#### **A. *Escherichia coli* en la avicultura**

Dentro de los patógenos bacterianos de mayor importancia se encuentra *Escherichia coli*, bacilo Gram negativo<sup>(41,42)</sup>, causante de la colibacilosis aviar y de cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial<sup>(43)</sup>.

La colibacilosis es un síndrome complejo caracterizado por lesiones multiorgánicas, tales como aerosaculitis asociada a pericarditis, perihepatitis y peritonitis, que resulta en alta morbilidad y mortalidad<sup>(44)</sup>. Este síndrome, causado por cepas patogénicas de *E. coli* (APEC), puede presentarse tanto de forma local como sistémica<sup>(41)</sup>.

*E. coli* es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre<sup>(45,46)</sup> y por tanto, se elimina por las heces al exterior. *E. coli* está incluida en el género *Escherichia* dentro del Filum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales, y Familia *Enterobacteriaceae*, cuyas características generales propuestas por Garrity *et al.*,<sup>(47)</sup> son las siguientes:

- Bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos.
- No formadores de esporos.
- Anaerobios facultativos, con un amplio rango de temperatura de incubación.
- Pueden ser inmóviles o móviles gracias a flagelos peritricos.
- Presentan necesidades nutricionales muy básicas y sencillas.

Las principales categorías son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* productora de shigatoxinas o verotoxinas (STEC/VTEC) y dentro de éste enterohemorrágica (EHEC)<sup>(48)</sup>.

Los patotipos ETEC se caracterizan por producir fimbrias adhesivas y enterotoxinas, las cuales se clasifican en termoestables o termolábiles<sup>(49)</sup>. ETEC es causante de las diarreas del viajero en humano, además de provocar diarrea en animales jóvenes. No obstante, no se considera este patotipo zoonótico debido a que las fimbrias de adhesión son específicas para cada especie<sup>(50)</sup>.

Los patotipos EPEC no producen toxinas, pero al adherirse producen lesiones denominadas como “attaching effacing lesions” que comprometen la integridad y apariencia del intestino grueso, invadiendo luego las células epiteliales. Es causa importante de diarrea, por consumo de comida y agua contaminada<sup>(50)</sup>.

Se desconoce aún el mecanismo patológico de EAEC<sup>(49)</sup>, aunque se ha asociado con diarrea crónica. In vitro se adhieren a células, formando un patrón agregativo, y ciertas cepas producen enterotoxinas termoestables<sup>(50)</sup>.

Los patotipos EIEC producen enfermedad de forma similar a *Shigella* spp., ya que a diferencia de otros patotipos de *E. coli* son capaces de invadir y formar colonias dentro de las células epiteliales del colon<sup>(50)</sup>. Produce una diarrea con presencia de sangre y mucus, y se asocia a consumo de agua o alimentos contaminados<sup>(49)</sup>.

El patotipo STEC (o VTEC), se caracteriza por producir shiga toxinas o verotoxinas, denominándose también STEC o VTEC<sup>(48)</sup>. Reciben esta denominación ya que actúan como toxinas para las células Vero in vitro, además de ser similares a las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*<sup>(50)</sup>. Dentro de este patotipo es importante destacar el rol patógeno del EHEC,

el cual se caracteriza por provocar diarreas sanguinolentas en sus hospedadores; y, en ciertas ocasiones, el síndrome urémico hemolítico (HUS). Por otro lado, el patotipo EHEC posee un sistema de adhesión similar al de EPEC. Tanto STEC como EHEC provocan distintas patologías diarreogénicas, desde diarreas sanguinolentas o no sanguinolentas, colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico<sup>(51)</sup>.

#### **2.2.1.2. Bacterias benéficas en el TGI en aves**

Las poblaciones de bacterias benéficas, están relacionadas con la producción de vitaminas, el estímulo del sistema inmune vía no patogénica y la inhibición de bacterias patógenas<sup>(32)</sup>. La microflora benéfica está representada fundamentalmente por *Lactobacillus* y Bífidobacterias, y tiene un papel en la nutrición, detoxificación de ciertos compuestos, crecimiento y protección contra bacterias patógenas, influyendo directamente en la salud y bienestar del hospedero<sup>(24)</sup>.

Ante esto el mantenimiento de la salud intestinal depende entonces de una íntima pero armoniosa relación entre los microorganismos<sup>(52)</sup> y este balance afecta el comportamiento del pollo de engorde<sup>(53)</sup>. Dos vías se sugieren para estudiar esta afectación: la primera sugiere a la microbiota intestinal como componente importante para el desarrollo de los mecanismos de defensa de la mucosa intestinal<sup>(54)</sup> y la segunda que reconoce al conocimiento de la microflora normal como fundamental punto de partida para evaluar cambios en la composición y efectividad del uso de APC en pollos de engorde<sup>(19,54)</sup>. En ambos casos, un mejor acercamiento al monitoreo molecular de la microflora intestinal, abre amplias posibilidades para manipular la microbiota, con beneficios para la salud del huésped<sup>(55)</sup>.

### A. Importancia del *Lactobacillus* spp

El género *Lactobacillus* es uno de los predominantes en el ecosistema gastrointestinal de animales de granja<sup>(56)</sup>. Esta bacteria es un microorganismo reconocido como seguro y se encuentra dentro de las especies más comunes que se emplean en las preparaciones probióticas, con capacidad inhibitoria frente a una gran diversidad de patógenos. Por ejemplo, *L. casei* presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7 por medio de una combinación de sustancias de naturaleza peptídica, junto con una acción parcial del peróxido de hidrógeno y de la acidez del medio<sup>(57)</sup>. El estudio de Roldán *et al.*<sup>(58)</sup> puso de manifiesto la inhibición de este patógeno a partir de cepas de *L. casei* aisladas de un alimento cárnico fermentado. Vinderola y Reinheimer<sup>(59)</sup> también proponen el uso de cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices<sup>(60)</sup>. Otras investigaciones demuestran que las BAL pueden presentar actividad antagónica al enfrentarlas a cepas patógenas como *Salmonella enteritidis*<sup>(61,62)</sup>.

*Lactobacillus* spp pertenece a las bacterias ácidos lácticas (BAL) ubicadas en el grupo de las bacterias Gram positivas, siendo la mayoría bacilos delgados Gram positivos que se pueden presentar unidos en cadenas largas, muchos no presentan movilidad, aunque existen algunos que presentan flagelos peritricos, no son esporulados, y su reacción a catalasa y oxidasa es negativa<sup>(61)</sup>.

Presentan un metabolismo fermentativo produciendo ácido láctico como el producto final de la fermentación de los azúcares como; glucosa y lactosa por la vía de Embden-Meyer (glucólisis) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO<sub>2</sub> por la vía del ácido-6- Fosfogluconico. Requieren para su desarrollo de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas, por esta razón son tan abundante en la leche y sus

derivados<sup>(61,63)</sup>. Se pueden clasificar según el tipo de fermentación que realizan como homofermentativos y heterofermentativos. Muchos de estos microorganismos son considerados como probióticos ya que cumplen con características como: ser habitante normal del tracto intestinal, no ser patógenos ni tóxicos, deben sobrevivir al ambiente ácido del estómago y a las sales biliares del duodeno, además de presentar una capacidad de adherencia a las células epiteliales y deben adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a los microorganismos nativos, deben producir sustancias antimicrobianas y mejorar las funciones inmunes. Estas son las características que debe presentar un probiótico, y muchas de las BAL las cumplen <sup>(64)</sup>.

#### **A.1. Mecanismo de acción contra bacterias patógenas**

Existen muchos mecanismos por los cuales un microorganismo puede presentar una interacción negativa con otros, competencia por espacio, nutrientes, una tasa de crecimiento mayor o incluso una forma más eficaz de captar alimentos. Con respecto a las BAL su actividad antagónica o antimicrobiana ha sido atribuida a la producción y acumulación de los productos de la fermentación como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno. Además otro factor al cual es atribuida esta característica es la producción de bacteriocinas<sup>(63)</sup>.

Las bacteriocinas son sustancias extracelulares diferentes a los antibióticos, que son producidas de forma natural por algunas especies bacterianas como *Lactobacillus plantarum*, estas bacteriocinas exhiben una actividad inhibitoria frente a diferentes especies alterantes o patógenas<sup>(65)</sup>. Se han obtenido diferentes bacteriocinas producidas por BAL, y estas presentan espectros de inhibición específicos por algunos microorganismos, estas son usadas para inhibir el crecimiento de bacterias indeseables específicas y para inhibir el

crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos y patógenos como *Listeria* entre otros<sup>(66)</sup>.

Estos microorganismos resultan ser de una vital importancia dada la utilidad a nivel industrial, asegurando la estabilidad de los productos, manteniéndolos libres de contaminantes y alteradores. En este estudio se busca aislar e identificar cepas nativas a partir de productos lácteos artesanales que tengan las anteriores características y se puedan usar en una producción dando los valores agregados a los alimentos ya descritos.

### **2.2.2. Composición de la microbiota intestinal del ave.**

La composición de la microbiota dentro del tracto intestinal del pollo no es estática, presenta variaciones temporales relacionadas con la edad del ave y la variación espacial observada dentro de los diferentes compartimentos del tracto intestinal<sup>(67)</sup>. Estudios llevados a cabo hace algunos años mostraron que el TGI de las aves está colonizado por cerca de 640 especies bacterianas que pertenecen a 140 géneros diferentes<sup>(68)</sup>. En producción animal, se utilizan muchas estrategias para manipular grupos microbianos en el tracto intestinal con la esperanza de influir en la digestión y la absorción de nutrientes. Los enfoques más comunes para mejorar la microbiota intestinal incluyen: i) el uso de microbios benéficos, conocidos como probióticos, ii) aditivos prebióticos cuya función es alimentar a los miembros deseables de la microbiota, iii) aditivos simbióticos que consiste en la combinación de probióticos más prebióticos y iv) ácidos orgánicos (butírico, propiónico y/o acético) cuya función es acidificar intestinos para crear condiciones adecuadas para el desarrollo de una microbiota benéfica y alimentar la mucosa intestinal del huésped. Incluso los APC tienen que ver con la microbiota intestinal, estos se usan para suprimir la abundancia de organismos indeseables<sup>(69)</sup>.

Las aves poseen una resistencia natural e inmunidad un tanto limitadas contra la colonización e infección desarrollada especialmente por microorganismos potencialmente patógenos<sup>(70)</sup>. Por lo general hay bastante consenso en afirmar que el TGI de un pollo recién nacido es

estéril y que la colonización empieza en cuanto el pollito tiene el primer contacto con los microbios del medio ambiente que lo rodea. Por tanto, hay que tener en cuenta dicha influencia, la dieta que se administre, considerada el principal determinante del perfil microbiano<sup>(25)</sup> y el manejo y cuidado de las personas encargadas según Van Der Wielen P, *et al.*,<sup>(71)</sup>. Se ha observado que los primeros colonizadores a nivel microbiano pertenecen por lo general a la familia *Enterobacteriaceae* seguidos de cerca por bacterias del género *Clostridium* y *Lactobacillus* claramente representativos<sup>(30,31)</sup>. Las especies bacterianas tienen referencias variables respecto al substrato y a los requerimientos en cuanto a crecimiento se refiere. Se ha visto que la composición química del alimento digerido puede alterar la composición de la comunidad microbiana<sup>(72)</sup>.

Estudios recientes confirman este hecho situando a los Firmicutes como el filo predominante en las secuencias bacterianas de pollos con un 70%, Bacteroides supone el 12,3 % y el tercer grupo corresponde, a las Proteobacterias con un 9,3%. El grupo de los Firmicutes, que está formado sobre todo por especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Streptococcus*, es el más abundante tanto en íleon como en ciego<sup>(73)</sup>. También es importante destacar que cada región del intestino desarrolla su propio perfil microbiano y dicha comunidad se vuelve más compleja a medida que los pollos van creciendo<sup>(74)</sup>.

### **2.2.2.1. Microbiota del TGI en aves durante su vida productiva.**

#### **A. Fase pre-eclosión**

La cáscara de huevo evolucionó para ser una barrera contra los microorganismos<sup>(75)</sup>. Sin embargo, la cutícula que protege contra la cáscara de huevo puede degradarse, lo que provoca que los microorganismos penetren para llegar a las estructuras internas del mismo<sup>(76)</sup>. Esto puede ocurrir poco después de que se coloca el huevo en el nido, en las jaulas o en la cinta

transportadora, por lo tanto, la transmisión vertical de microorganismos también es posible desde la gallina hasta el pollo, aunque de forma diferente a los mamíferos. Los organismos patógenos tales como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* y *Campylobacter* pueden transmitirse verticalmente<sup>(77,78)</sup>. Los estudios de *Salmonella* y *Mycoplasma* han demostrado que las bacterias pueden estar presentes dentro del ovario. Es plausible aceptar la hipótesis de que los microorganismos beneficiosos también pueden transmitirse verticalmente. La anatomía del tracto reproductivo de la gallina sugiere que el embrión probablemente esté colonizado con organismos que se depositan antes de la formación de la cáscara de huevo. Los microorganismos podrían establecerse dentro del intestino de los embriones durante el desarrollo, especialmente cuando los embriones comienzan a ingerir el líquido amniótico. Además, si hay microorganismos en la yema, podrían internalizarse a medida que se introduce la yema al intestino en el desarrollo embrionario. La exposición embrionaria a las bacterias no es necesariamente letal y, de hecho, el desafío de los embriones de pollo se ha utilizado para detectar cepas patógenas de bacterias o virus<sup>(31)</sup>. Se ha informado que se pueden encontrar bacterias viables en los embriones, aunque el análisis molecular ha revelado que una baja diversidad indica una microbiota rudimentaria<sup>(19)</sup>. La detección de especies relacionadas con *Clostridium*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus* indican que estos organismos pueden transmitirse verticalmente de gallinas a polluelos incluso en condiciones comerciales de aves de corral<sup>(79)</sup>.

## **B. Fase Inicial**

Inmediatamente después de la eclosión, los polluelos tienen contacto con los microbios en su entorno. La incubadora comercial de huevos es una fuente de contaminación microbiana que permite a los pollos obtener microorganismos que pueden no tener efectos necesariamente mutualistas<sup>(80)</sup>.

El consumo de agua y alimentos resulta en una rápida adquisición de microorganismos adicionales, de hecho, el proceso de manejo, transporte y vacunación contribuye a la evolución de la microbiota intestinal de las aves. En el momento de la entrega a la granja avícola, la cría ya tiene una microbiota estructurada<sup>(19)</sup>. La organización de la microbiota intestinal ocurre rápidamente y las especies presentes dentro del pollo joven pueden estar presentes al final del período de crianza<sup>(81)</sup>. Es particularmente problemático, sí el colonizador inicial también tiene importancia para la inocuidad de los alimentos, como *Salmonella* y *Campylobacter*. Muchos estudios han demostrado que los patógenos transmitidos por los alimentos tienen más éxito en colonizar pollos jóvenes que están expuestos en la primera semana de eclosión cuando el ambiente intestinal cambia rápidamente y la microbiota es menos diversa e inestable<sup>(82)</sup>.

En la granja, el uso de sistemas de cama profunda permite la exposición a una gran diversidad de microbios ambientales e intestinales, lo que aumenta en gran medida el número de genotipos en el intestino del pollo. Durante este tiempo, la microbiota del ciego en las aves jóvenes es relativamente simple y muy similar a la microbiota observada en el intestino delgado<sup>(31)</sup>, lo que indica que los compartimentos ambientales espaciales aún no se han desarrollado en el intestino. A los 3 días de vida, la microbiota ileal del pollo contiene una gran proporción de bacterias ambientales<sup>(31)</sup>, especialmente si las aves se crían en camas profundas<sup>(83)</sup>, mientras que, a los 7 días de edad los polluelos contienen una microbiota de la mucosa ileal dominada principalmente por *Lactobacillus*, seguida de *Lachnospiraceae* no clasificada y *Enterococcus*<sup>(83)</sup>. Después de la segunda semana de vida, el intestino delgado y el ciego desarrollan comunidades claramente diferentes. Probablemente se pueda atribuir a la maduración de los entornos espaciales, incluidas las diferencias en el pH, las condiciones de anaerobiosis (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>), los

surfactantes, la osmolaridad, los sustratos y los metabolitos bacterianos (como los ácidos grasos de cadena corta)<sup>(83)</sup>.

La densidad bacteriana en el íleon de pollitos tipo broiler con un día de edad fue del orden de  $10^8$  UFC/g de contenido intestinal, mientras que para el ciego el número está más cerca de  $10^{10}$  UFC/g. A partir del día tres de edad estos números aumentaban a  $10^9$  y  $10^{11}$  UFC/g y así se mantenían estables durante los siguientes treinta días de vida del pollo<sup>(68)</sup>.

### C. Fase de engorde

Muchos informes ahora revelan la composición de la comunidad microbiana del íleon de pollo durante el engorde. Por ejemplo, Nakphichit *et al.*<sup>(84)</sup> observaron que el organismo más abundante en el intestino delgado era *Lactobacillus* cuya diversidad aumentó de 21 a 42 días de edad. *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. oris* y *L. crispatus* se detectaron a los 21 días de edad, semanas después, se observaron en abundancia secuencias relacionadas con *L. gallinarum*, *L. equi*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. aviaries*, *L. johnsonii* y *L. reuteri*. Estos estudios revelan que aunque *Lactobacillus* domina el microbioma del intestino delgado, hay una sucesión de especies y cepas que dependen de la edad de las aves. En contraste, los estudios que utilizan técnicas de cultivo tradicionales han descrito una comunidad de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Clostridium*<sup>(85)</sup> que ilustran las limitaciones de los métodos de placa tradicionales<sup>(79)</sup>. Lu *et al.*<sup>(31)</sup> describieron un aumento en la población de *Clostridium* en el íleon de pollos de engorde desde la fase de inicio hasta la fase de crecimiento con una riqueza creciente al final del período de crianza<sup>(86)</sup>.

La maduración de la microbiota intestinal posibilita generar un ecosistema dinámico pero estable que representa una protección contra organismos patógenos. Sin embargo, el uso de

antibióticos ha mostrado ser perjudicial en el desarrollo de la microbiota intestinal (generando una involución hacia etapas más inmaduras) e incluso cuando la microbiota ya está desarrollada se ha observado cambios severos en la composición de la misma<sup>(79)</sup>.

#### **2.2.2.2. Microbiota en aves, según órganos del TGI**

De acuerdo con Lu J *et al.*,<sup>(31)</sup> los grupos que predominan en la comunidad bacteriana intestinal del pollo son los pertenecientes al grupo de las Gram positivas alto GC (contenido de guanina y citosina) y bajo GC (filos Actinobacterias y Firmicutes, respectivamente), filo Proteobacterias y filo Bacteroides.

Wei S, Morrison M, Yu Z.<sup>(73)</sup> sitúa a los Firmicutes como el filo predominante en las secuencias bacterianas de pollos con un 70%, Bacteroides supone el 12,3% y el tercer grupo corresponde a las Proteobacterias con un 9,3%. El grupo de los Firmicutes, que está formado sobre todo por especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus*, *clostridium*, *Bacillus* y *Streptococcus*, es el más abundante tanto en el íleon como en el ciego.

##### **A. Microbiota en el íleon de aves.**

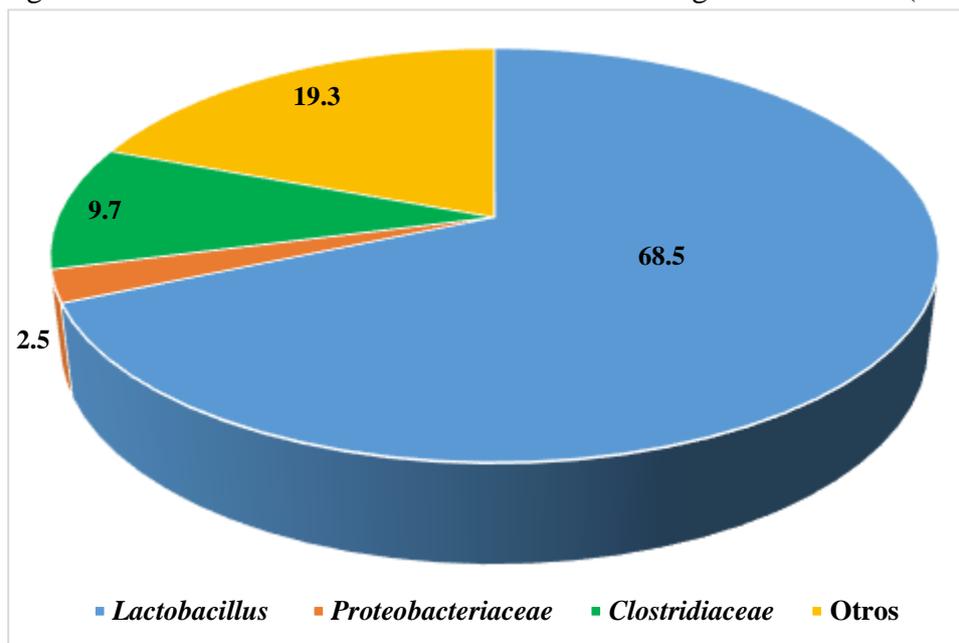
La microbiota dentro del intestino delgado es escasa en el duodeno y más abundante en el yeyuno y el íleon. Las especies del género *Lactobacillus* son las más abundantes en este tramo del intestino en un 68,5% del total, mientras que el 2,5% se corresponde con la familia de las Proteobacteriaceae entre las cuales se incluye *Echerichia coli*.

Por otra parte Dumonceaux *et al.*,<sup>(87)</sup> observó que aproximadamente el 90% de la microbiota del intestino delgado de pollos está compuesta por *Lactobacillus*. Lu *et al.*,<sup>(31)</sup> determinó que el 70% de las secuencias del íleon eran *Lactobacillus*, y el resto estaba relacionado con *Clostridiaceae* (11%), *Streptococcus* (6,5%) y *Enterococcus* (6,5%).

Sin embargo, la microbiota del intestino delgado puede ser bastante sensible a los cambios en la dieta. El intestino delgado es la principal zona de digestión y absorción de nutrientes y la composición de la microbiota podría contribuir positivamente a los procesos digestivos<sup>(69)</sup>.

Las especies del género *Lactobacillus* son las más abundantes en este tramo del intestino, en un 68,5% del total, mientras que el 2,5% se corresponde con la familia de las *Proteobacteriaceae* entre las cuales se incluye *Escherichia coli*. Otras secuencias relacionadas con la familia *Clostridiaceae* representan el 9,7% del total (figura 2). De los 7-21 días de edad las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* y *Enterococcus* son las dominantes. Para el resto de edades se aplica la generalidad de las especies dominantes del íleon<sup>(31)</sup>. Recientemente se ha sabido que el íleon es una fuente de bacterias nuevas, especialmente productoras de butirato. Dado que la función de esta parte del intestino es la de absorber nutrientes, parece ser que un número considerable de estas bacterias desconocidas pueden influir en la biodisponibilidad de los nutrientes y en la tasa de absorción, mejorando de esta forma el rendimiento productivo de los broilers<sup>(88)</sup>.

Figura 2. Microbiota más abundante en el tracto gastrointestinal (TGI).



Fuente: Stanley<sup>(88)</sup>

## B. Microbiota en ciego de aves.

El ambiente cecal alberga predominantemente los Phylum Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, la mayoría de los cuales son anaerobios estrictos<sup>(89)</sup>. El 16S rRNA revela que la mayoría están relacionados con *Clostridium leptum*, *Sporomusa* spp., *Clostridium coccoides* y entéricos<sup>(30)</sup>.

El grupo más abundante es este tramo del intestino el perteneciente a la familia *Clostridiaceae*, con aproximadamente un 60%. Las bacterias pertenecientes al grupo de las *Actinobacterias* ocuparían un 13,9% mientras que menos del 10% se corresponde a bacterias Gram negativas y de ellas el 2,8% a la familia *Proteobacteriaceae* y el 5,1% a la familia *Bacteroidaceae*. A los 3 días de edad de los pollos, las *Proteobacterias* se encuentran en un porcentaje de 15% mientras que *Lactobacillus* spp representan el 25% del total. Para el resto de edades, se aplica la generalidad de las especies dominantes del ciego. Dentro de la familia *Clostridiaceae*, los géneros *Clostridium*, *Eubacterium*, y *Ruminococcus* domina la comunidad bacteriana del ciego del

pollo adulto<sup>(31)</sup>. Estudios recientemente desarrollados sugieren que el número de Firmicutes en este tramo intestinal ascendería a un 78% del total, mientras que los Bacteroides ocuparían un 11%<sup>(73)</sup>.

A pesar de todo lo indicado en líneas anteriores, hay que tener en cuenta que un estudio de reconocido prestigio sugiere que el 10% de las bacterias intestinales presentes en los pollos son especies conocidas, mientras que 35% se desconocen pero podrían relacionarse con un género conocido y el restante porcentaje (55%) es completamente desconocido<sup>(68)</sup>. Por otro lado, Van der Wielen *et al.*,<sup>(71)</sup> demostraron que la diversidad de la microbiota intestinal aumenta con la edad, especialmente en los ciegos. Dentro de un mismo grupo, diferentes individuos pueden presentar comunidades microbianas muy diferentes, y animales de la misma edad y raza pueden tener poblaciones microbianas únicas.

Tabla 1. Composición de la microbiota en el íleon y ciego en pollos

Microbiota	Ciego	Ileon
<i>Lactobacillus</i>	8.00	70.00
<i>Ruminococcus</i>	16.48	0.44
<i>Clostridiaceae</i>	68.00	11.00
<i>Proteobacteriaceae</i>	2.80	2.50
<i>Bacteroidaceae.</i>	5.10	0.60
<i>Streptococcus</i>	1.70	13.20
<i>Fusobacterium</i>	14.00	0.90
<i>Escherichia</i>	1.29	0.35
<i>Campilobacter</i>	0.00	0.88

Fuente: Lu J, *et al.*<sup>(31)</sup>

### 2.2.3. Mango (*Mangifera indica* L.)

El mango (*Mangifera indica*) es un importante cultivo frutícola que se cultiva en los trópicos principalmente por su pulpa. La semilla de mango, que representa entre el 20 y el 60% de la fruta, tiene un uso limitado de alimentos o industrial en la mayoría de los países productores y, por lo tanto, se desperdicia. El grano contenido en la semilla (grano de semilla de mango: MSK) es una buena fuente de carbohidratos (58-80%), contiene cantidades moderadas de proteínas (6-13%) y grasa (6-16%). y su aceite es una buena fuente de ácidos esteárico y linoleico<sup>(8)</sup>.

#### 2.2.3.1. Composición de harina de semilla de mango

Hay un vasto cuerpo de información sobre la composición nutricional de harina de semillas de mango (MSK, siglas en inglés), sin embargo, es difícil culto para dar valores representativa de los componentes, ya que varían ampliamente; sin embargo, es difícil dar valores representativos para los constituyentes, ya que varían ampliamente (Tabla 2).

Tabla 2 Composición proximal de harina de semilla de mango (HSM), maíz y granos de sorgo (g / 100 g de MS).

Constituyentes	HSM	Grano de Maiz	Grano Sorgo
Materia seca	89 -91.5	86	89
Proteína cruda	6 - 10.	8 - 9.	9.8 - 10
Fibra bruta	1.11 - 2.9	2.0 - 2.2	2.0 - 3.5
Extracto de éter	7.87- 14.80	3.5 - 3.8	4.4
Extracto sin nitrógeno	67 – 82	--	--
Energía metabolizable (Kcal / kg)	3,275 - 3,454 *	3,330 - 3,514	2,650 - 3,464
Referencia	1, 2, 3, 4, 5, 6	3,7,8	7,8

\* Valor para la semilla de mango hervido

1: Sandhu and Lim<sup>(90)</sup>; 2: Fowomola<sup>(91)</sup>; 3: Diarra *et al.*,<sup>(14)</sup>; 4: Odunsi<sup>(92)</sup>; 5: Dakare *et al.*,<sup>(93)</sup>; 6: Kittiphoom<sup>(94)</sup>; 7: Jadhav and Siddiqui<sup>(95)</sup>; 8: Damron<sup>(96)</sup>

La harina de semilla de mango (HSM) es una buena fuente de almidón (58-80%)<sup>(90,97)</sup> y tiene un alto contenido de grasas que se combinan para proporcionar un valor de energía metabolizable (ME) comparable al del maíz<sup>(14)</sup>. Sin embargo, se informa que los

carbohidratos contenidos en MSK son poco digeridos por las aves de corral. Ravindran y Rajaguru<sup>(98)</sup> informaron que solo el 52.5% de los carbohidratos de HSM fueron metabolizados por las aves de corral. El contenido de proteínas de HSM seco ( 6-13 %) <sup>(14,92,98)</sup> es comparable a la del maíz y tiene un buen perfil de aminoácidos esenciales, especialmente en términos de lisina y metionina<sup>(91)</sup> (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil de aminoácidos esenciales de harina de semilla de mango (HSM), maíz, granos de sorgo y harina de soya.

Aminoácidos esenciales	HSM	Maíz	Sorgo	Harina de Soya
Lisina	3.13 - 5.0	0.26	0.22	2,22
Metionina	1.04 - 2.2	0.17	0.17	0,53
Treonina	2.04 - 4	0.29	0.31	1.41
Arginina	5,17 - 9.0	0.37	0.38	2,60
Valina	3.80 - 5.2	0.39	0.46	1.68
Histidina	2,31 - 2.7	0.23	0.23	0.96
Fenilalanina	4.46 - 4.60	0.39	0.49	1.83
Isoleucina	3,23 - 4.60	0.28	0.37	1.61
Referencias	1, 2, 3	4	4	4

1: Fowomola<sup>(91)</sup>; 2: Jadhav and Siddiqui<sup>(95)</sup>; 3: Kittiphoom<sup>(94)</sup>; 4: NRC<sup>(99)</sup>

La comida de HSM es moderadamente rica en aceite (6-16%) <sup>(14)</sup>, lo cual es una buena idea. fuente de ácidos esteárico (24-57%) y oleico (34-56%) que se pueden fraccionar para producir oleína y estearina<sup>(100)</sup>.

### 2.2.3.2. Efectos del procesamiento sobre el contenido factores antinutricionales (FAN) de harina de semilla de mango (HSM).

Se han investigado los efectos de diferentes métodos de procesamiento en la reducción de FAN en HSM. El remojo y la ebullición se informó que significativamente reducir el contenido de FAN de HSM. Una ventaja adicional de remojar o hervir se vio como un aumento en el contenido de energía

metabolizable (EM) del kernel<sup>(12,14)</sup>. Ravindran y Sivakanesan<sup>(12)</sup> observaron un aumento en el EM de 7.9 MJ / kg de MS en el grano crudo seco a 10.3 MJ / kg de DM en los granos hervidos y remojados. El aumento libre de nitrógeno. El extracto (carbohidratos solubles) observado en los granos procesados en comparación con los granos crudos<sup>(12,14,93)</sup> probablemente se debió a la descomposición de las fracciones de carbohidratos complejos. Recientemente, Amao y Siyanbola<sup>(15)</sup> informaron un aumento en el contenido de ME en el HSM tratado con calor seco en comparación con el HSM sin procesar.

El Boushy y Van Der Poel<sup>(101)</sup> observaron que el remojo fue más eficiente en la eliminación de taninos de HSM de tratamiento de ebullición, ácido o álcali. En otro informe, Ravindran y Sivakanesan<sup>(12)</sup> encontraron ebullición sea más eficiente en la eliminación de taninos y ácido fulmínico (HCN) en comparación con el remojo. El tratamiento con ácido seguido de un tratamiento alcalino eliminó todos los taninos y gran parte de los glucósidos cianogénicos de MSK<sup>(102)</sup>. Dakare *et al.*,<sup>(93)</sup> informaron una reducción significativa del tanino, el HCN, la actividad inhibidora de la tripsina y el oxalato en ebullición en comparación con la harina de semilla de mango (HSM) mojado, mientras que la ebullición en álcali fue la más eficiente en la reducción del contenido de ácido fítico. Los autores observaron que la cocción después del remojo redujo aún más la concentración de estos factores en el mango.

### **2.2.3.3. Alimentación en pollos de engorde.**

La alimentación de HSM a pollos de engorde está bien documentada. Patil *et al.*,<sup>(102)</sup> observaron que reemplazar el 14.1% de maíz dietético con HSM crudo no tuvo efectos adversos en el crecimiento de pollos de engorde, pero el reemplazo de 28.2% causó que el crecimiento se viera afectado

adversamente. En corroboración, Tegua<sup>(103)</sup> informó efectos adversos sobre el aumento de peso y el consumo de alimento de los pollos de engorde alimentados con un 20% de HSM molido como reemplazo del maíz. Recientemente, Amao y Siyanbola<sup>(15)</sup> observaron el consumo de alimento significativamente inferior, mayor peso corporal y mejor conversión del alimento en pollos de engorde finalización alimentaron 30% calor seco tratado HSM como un reemplazo para el maíz en comparación con el maíz alimentado grupo de control.

Hay informes que muestran que las pérdidas de rendimiento en aves alimentadas con HSM crudas por encima del 10% de la dieta (como reemplazo del maíz) se redujeron con el procesamiento<sup>(14,92)</sup>. Odunsi<sup>(92)</sup> observado depresión significativa del crecimiento no puede en pollos alimentados más de 10% en bruto HSM como un reemplazo para el maíz, mientras que la sustitución del 20% con empapado HSM no tuvo efectos adversos sobre el crecimiento de pollos de engorde. Del mismo modo, Joseph y Abolaji<sup>(104)</sup> no observaron reacciones adversas.

Los efectos de la alimentación 10% en bruto o 20% de semilla de mango hervida como un reemplazo para el maíz en el rendimiento de pollos de engorde (consumo de alimento, ganancia de peso y alimentar eficiencia). El sabor amargo de HSM se ha atribuido principalmente a la presencia de taninos<sup>(12,105)</sup>. Ravindran y Sivakanesan<sup>(12)</sup> observaron mejoras en el rendimiento de los pollos de engorde con HSM procesado en paralelo con la reducción de taninos, lo que indica que los taninos son en gran parte responsables del pobre valor nutritivo del HSM crudo.

Se ha informado el efecto de la edad en la capacidad de las aves para tolerar la HSM en la dieta. Diarra y Usman<sup>(106)</sup> observaron que la sustitución de maíz 20% con HSM prima en pollos de engorde dietas fue significativo en el rendimiento

durante la fase de arranque que se compensa durante la fase final; lo que sugiere que la capacidad de los pollos de engorde para utilizar harina de semilla de Mango (HSM) aumenta con la edad. Del mismo modo, Diarra *et al.*,<sup>(14)</sup> informaron que la sustitución de 50 y 70% de maíz en la dieta con HSM hervido en la fase de arranque y final de pollos de engorde fueron significativamente respectivamente en el costo de alimentación sin efectos adversos sobre el crecimiento y la utilización del alimento.

#### **2.2.3.4. Actividad antimicrobiana**

Se estudiaron las características de un nuevo compuesto antimicrobiano en extracto de etanol de semilla de mango. El análisis cualitativo de la harina de semilla de mango (HSM) mostró que los polifenoles son el componente principal de la HSM<sup>(8)</sup>. El extracto de semilla de mango contiene gran cantidad de polifenoles (79.5% mg / 100 mg seco húmedo) que le da el poder antibacteriano más efectivo contra las bacterias grampositivas que las bacterias gramnegativas, aunque la actividad antimicrobiana contra las bacterias del ácido láctico es inefectiva; su actividad antimicrobiana contra cepas son las siguientes: *E. coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Clostridium botulinum*, *Cl. Perfringens*, *Listeria monocytogenes*<sup>(107)</sup>.

Compuestos fenólicos, como la galanginina, cuyo mecanismo de acción inhibe el ADN girasa de células bacterianas, además de inhibir la enzima topoisomerasa IV<sup>(9)</sup>. Denny *et al.*,<sup>(10)</sup> observaron actividad frente a las beta lactamasas, estas actividades no pueden atribuirse a la presencia de una sola molécula del fruto, sino a la acción de los compuestos de

carácter fenólico que ejercen efectos sinérgicos, formando un fitocomplejo activo en la inhibición microbiana.

Los espectros antimicrobianos de la HSM y otras fuentes de polifenoles, catequinas crudas en el té verde y teaflavinas crudas en el té marrón, se muestran en la Tabla 4. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las catequinas crudas y las teaflavinas crudas son más bajas contra las bacterias grampositivas que contra las bacterias gramnegativas. El espectro antimicrobiano de la HSM tiene la misma tendencia. Sin embargo, hay algunas diferencias en los espectros antimicrobianos entre el HSM y las catequinas. Las CMI de HSM contra *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* son de 100 y 50 ppm, mientras que los de las catequinas crudas y las ceras de té son superiores a 1000 ppm. La diferencia sugiere que las estructuras moleculares de los polifenoles, como componentes activos en el HSM, difieren de las del té verde o marrón<sup>(8)</sup>.

Tabla 4. Comparación de la actividad antimicrobiana (MIC) de la HSM y los polifenoles

Tensión del indicador	HSM (ppm)	Catequinas crudas del té verde <sup>a</sup> , (ppm)	Teaflavinas crudas del té <sup>a,b</sup> (ppm)
<i>Escherichia coli</i>	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Salmonella sp.</i>	2500	> 1000	> 1000
<i>Aeromonas sp.</i>	> 1000	> 400	300 ± 700
<i>Campylobacter jejuni</i>	100	> 1000	> 1000
<i>Vibrio sp.</i>	500	200 ± 500	300 ± 400
<i>Yersinia Enterocolitica</i>	50	> 1000	> 1000
<i>Stabylococcus aureus</i>	50 ± 1000	450	500
<i>Bacillus sp.</i>	500	600	500
<i>Clostridium sp.</i>	<50	400	200

Fuente: Hara e Ishigami<sup>(108)</sup>

<sup>a</sup>- Las CMI se determinaron en agar nutricional. Las catequinas crudas se obtuvieron mediante extracto de acetato de etilo del té verde. <sup>b</sup>- Las tomas de té crudas se obtuvieron mediante extracto de metilisobutilcetona a partir de té marrón.

#### **2.2.4. Polifenoles como antimicrobianos**

Dentro de los polifenoles están los flavonoides presentes en las células de la fotosíntesis y se encuentran comúnmente en frutas, vegetales, nueces, semillas, tallos, flores, té, vino, propóleo y miel. Durante siglos, las preparaciones que contienen estos compuestos como los principales constituyentes fisiológicamente activos se han utilizado para tratar enfermedades humanas. Se caracterizan por poseer al menos un anillo bencénico y uno o varios grupos hidroxilos<sup>(9)</sup>. Según Cheynier *et al.*,<sup>(109)</sup> los polifenoles se clasifican fundamentalmente en compuestos no flavonoides, entre los que se encuentra el ácido gálico y flavonoides, entre los que podemos mencionar a la catequina. Los últimos se diferencian en que tienen un esqueleto C6-C3-C6.

La importancia de estos compuestos se debe a su estrecha relación con las características sensoriales de los alimentos tales como el color, astringencia, amargor y aromas<sup>(110)</sup>. Asimismo, se ha observado que cumplen un rol biológico en la protección y mantención de las diferentes especies de plantas<sup>(111)</sup>. Diversos estudios, señalan que estos compuestos poseen un amplio número de efectos en la salud, entre los que se mencionan las actividades antioxidante, antialérgica, anticancerígena, antiinflamatoria y antimicrobiana<sup>(112,113)</sup>. La actividad antimicrobiana de los polifenoles consiste en inhibir el crecimiento de algunas bacterias con incidencia sobre la salud, tales como *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*<sup>(114,115)</sup>.

##### **2.2.4.1. Efecto antimicrobiano**

Los flavonoides se han aislado de muchas drogas vegetales debido a que son productos naturales muy comunes. A sus polifenoles se les ha atribuido una cantidad de acciones que van desde actividades inhibitoras de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasas, ATP-ases, liasas, hidroxilasas, transferasas, oxidorreductasas y cinasas), hasta acción antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana y antiviral<sup>(116)</sup>.

#### **A. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.**

Estudios realizados por Mori,<sup>(117)</sup> demostraron que el anillo B de los flavonoides puede desempeñar un papel en la intercalación o el enlace de hidrógeno con el apilamiento de las bases de ácido nucleico y que esto puede explicar la acción inhibitoria sobre la síntesis de ADN y ARN. Otros estudios reportado por Plaper *et al.*,<sup>(118)</sup> informaron que la quercetina se une a la subunidad GyrB de la girasa del ADN de *E. coli* e inhibe la actividad ATPasa de la enzima. La unión a la enzima se demostró aislando la girasa del ADN de *E. coli* y midiendo la fluorescencia de la quercetina en presencia y ausencia de las subunidades de la girasa, por lo tanto, la inhibición de la actividad de GyrB ATPasa por quercetina es la responsable de la actividad antibacteriana.

#### **B. Inhibición de la función de la membrana citoplásmica.**

Otro grupo, Ikigai y sus colegas, llevaron a cabo una investigación sobre el galato (-)-epigallocatequina, una catequina fuertemente antibacteriana que se encuentra en el té verde. Las catequinas actúan principalmente y dañan las membranas bacterianas. No se sabía cómo se produjo este daño, pero se presentaron dos teorías. Primero, las catequinas pueden perturbar las bicapas lipídicas al penetrarlas directamente e interrumpir la función de barrera. Alternativamente, las catequinas pueden causar la fusión de la membrana, un proceso que provoca la fuga de materiales intramembranosos y la agregación. Curiosamente, el grupo también demostró que la fuga inducida por el galato de epigallocatequina fue significativamente menor cuando se prepararon membranas de liposomas que contenían lípidos cargados negativamente. Por lo tanto, se sugirió que la baja susceptibilidad a la catequina de las bacterias Gram negativas puede atribuirse, al menos en parte, a la presencia de lipopolisacáridos que actúan como barrera<sup>(119)</sup>. También se ha demostrado por Sato *et al.*, que la metilcalcona induce la fuga de sustancias absorbentes de 260 nm de S.

mutans. Esta observación generalmente indica una fuga de material intracelular como un nucleótido, y los autores sugirieron que 2,4,2 -trihidroxi-5. La metilcalcona ejerce su efecto antibacteriano cambiando la permeabilidad de la membrana celular y dañando la función de la membrana<sup>(120)</sup>.

### **C. Inhibición del metabolismo energético.**

Estudio por parte de Haraguchi *et al.*, demostraron la acción antibacteriana Licochalcona A y C, estos flavonoides demostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *Micrococcus luteus* pero no contra *E. coli*. El grupo planteó la hipótesis de que los licocalcones podrían estar interfiriendo con el metabolismo energético de manera similar a la inhibición de las vías respiratorias. Antibióticos, ya que se requiere energía para la captación activa de diversos metabolitos y para la biosíntesis de macromoléculas. Curiosamente, se encontró que los licocalcones inhiben fuertemente el consumo de oxígeno en *M. luteus* y *S. aureus* pero no en *E. coli*, que se correlacionó bien con el espectro observado de actividad antibacteriana. El grupo demostró además que los licocalcones A y C inhibían eficazmente la NADH-citocromo c reductasa , pero no la citocromo c oxidasa o la NADH-CoQ reductasa<sup>(108)</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIALES**

- Placas Petri
- Jeringas
- Tubos de ensayo
- Matraz
- Pipeta
- Probeta
- Mechero
- Estufa
- Horno
- Autoclave
- Gradilla
- Balanza
- Bisturí
- Agua destilada
- Ron de quemar
- Viales
- Asa en argolla no calibrada
- Algodón
- Estuche de disección
- Balanza
- Bolsas herméticas
- Mascarilla, guantes, redecilla
- Alcohol, yodo.
- Hilo (nylon).

#### **3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

- 400 Pollos Broiler

#### **3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO**

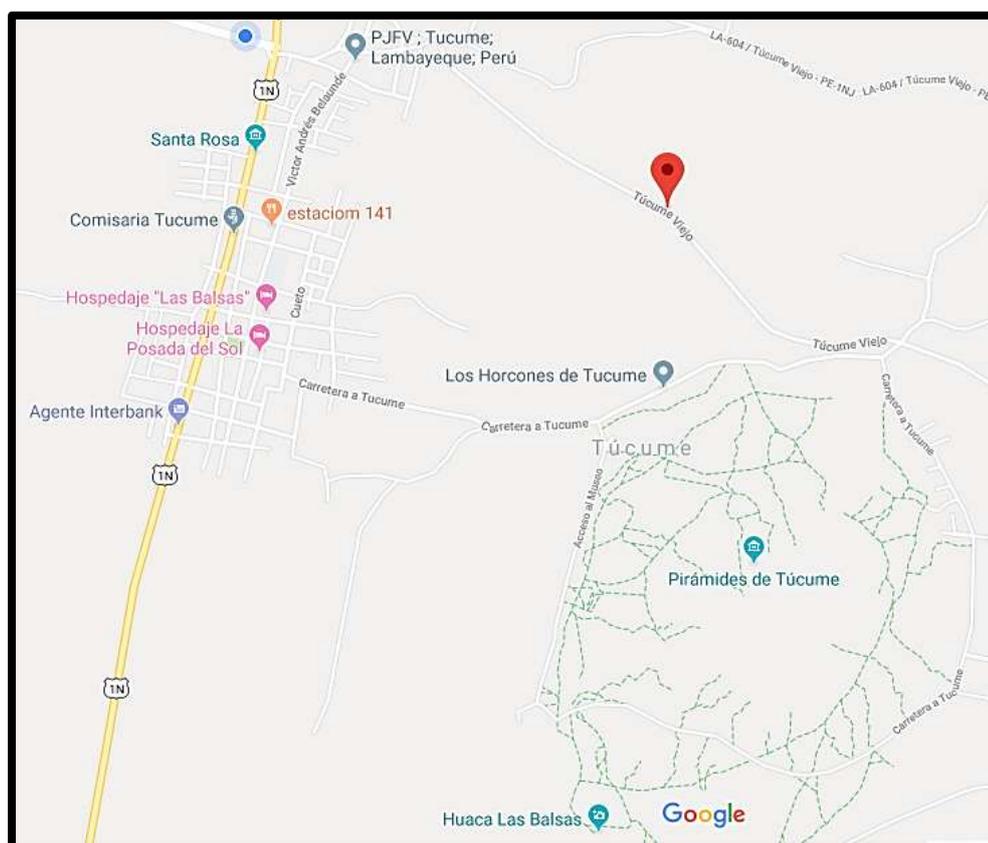
- Agar cromogénico TBX
- Agar MRS
- Agar Peptona

## 3.2. DISEÑO METODOLÓGICO

### 3.2.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La investigación se realizó en un galpón en el distrito de Túcume, departamento y provincia de Lambayeque, ubicada a  $6^{\circ}30'22''$  latitud sur y  $79^{\circ}51'26''$  latitud oeste. La crianza de los pollos abarco desde el mes de diciembre del 2018 hasta febrero 2019, con una temperatura de 29 - 31°C. La latitud sobre el nivel del mar es de 46 m <sup>(121)</sup>; 85 % de humedad relativa; 41 mm de precipitación. La variación en la precipitación entre los meses más secos y más húmedos es 25 mm. <sup>(122)</sup>.

Figura 3. Mapa satelital del lugar de estudio: Túcume – Lambayeque.



Fuente: Googlemaps<sup>(123)</sup>

### 3.2.2. Adecuación del galpón.

Se adecuó un galpón 15 días de anticipación a la llegada de los pollos, realizando actividades como fumigación dejando secar por un día y posteriormente se roció cal todo el piso dejándolo 15 días. Luego se introdujo cama a base de viruta de madera de 10 cm de profundidad, con su respectivo comedero y bebedero y por último cada uno de los tratamientos fueron identificados.

Figura 4. Instalación del galpón experimental



### 3.2.3. Procesamiento de semilla de mango

Se tomaron muestras de semillas de mango (*Mangífera indica L.*). Las semillas de mango fueron adquiridas de empresas agroindustriales ubicada en Lambayeque. Secado a temperatura ambiente por 20 días tomando las sugerencias que indican las investigaciones de Martínez, *et al.*<sup>(124)</sup> y Chiroque *et al.*<sup>(125)</sup>; luego se sometieron a una temperatura de 100°C (Figura 5 y 6) para eliminar las sustancias antinutricionales que contiene la semilla de mango<sup>(14)</sup>.

Figura 5. Proceso de hervido en semillas de mango.



Se tomó en consideración que las semillas de mango tuvieran el mismo tiempo de almacenaje, sin tratamiento químico, físico o biológico y se secaron a temperatura ambiente (Figura 6).

Figura 6. Almacenaje y secado de semillas de mango



Las semillas de mango fueron sometidas a molinaje, empleando un molino de martillo (Figura 7), logrando reducirlas a un tamaño de 1 mm y conservación a temperatura ambiente.

Figura 7. Molienda de semilla de mango



#### **3.2.4. Análisis bromatológico de harina de semilla de mango**

La composición bromatológica y el fraccionamiento de la fibra de harina semillas de mango se realizaron en el Laboratorio acreditado de Análisis de Físico Químico de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú, evaluando los siguientes indicadores: Humedad, ceniza, grasa, proteína, fibra, carbohidratos totales (Anexo 1).

#### **3.2.5. Alimentación**

Se elaboró dietas para los 4 tratamientos, las cuales fueron isoproteicas e isoenergéticas para anular los efectos dietéticos en las variables de estudio. Las dietas que se elaboraron fueron: Tratamiento control (T0: sin adición de harina de semilla de mango) y 3 grupos experimentales los cuales fueron; T1 (10% de semilla de mango), T2 (25% de semilla de mango) y T3 (50% de semilla de mango) para las tres fases de producción: Inicio, Crecimiento y Acabado. (Anexo 2,3 y 4 respectivamente)

#### **3.2.6. Necropsia**

Las aves por cada fase productiva se sacrificaron utilizando la siguiente técnica<sup>(126)</sup>:

- a) Se humedecieron las plumas del ave con una solución de agua más un antiparasitario externo para eliminar a piojos, pulgas y garrapatas.
- b) Se dejó al ave en una superficie inclinada para que pierda gran parte del agua que usaron para bañarla, durante 5 minutos.
- c) Se realizó un piquete con la tijera en la piel por debajo de la punta de la quilla del esternón, a nivel de la línea media hasta llegar cerca al buche y se debe cortar con mucho cuidado porque la piel tiene poca grasa en el estrato subcutis y la pared de esta parte del esófago está muy cerca de la piel; se terminó el corte en el vértice del pico inferior.
- d) El piquete que se hizo, se dirigió hacia atrás por la línea media y luego se divulsionó para separar la piel del abdomen. Al llegar el corte al nivel de la mitad de la quilla se extendió a la derecha e izquierda por la parte craneal de cada pierna, para separar la piel completamente.
- e) Con los dedos índice y pulgar de cada mano se cogió cada muslo y se hizo palanca para separar la cabeza de cada fémur de su respectiva fosa acetabular del cinturón pelviano.
- f) Se expusieron los órganos que se ubican a lo largo del cuello: esófago anterior y buche, tráquea, timo y las glándulas tiroideas y paratiroides, vasos sanguíneos y nervios, hasta llegar al vértice del pico inferior.
- g) Con la tijera se cortaron los músculos de la pared abdominal, a la altura de la punta de la quilla, lo continúan en dirección caudal por la línea media, para separar los diferentes tejidos componentes. Posteriormente se incidió en el peritoneo para exponer el tejido adiposo y los sacos aéreos que cubren las vísceras celómicas.
- h) Se localizó las articulaciones costo condrales de ambos lados y se cortaron, con los músculos aledaños: costo esternal, externo coronal, sub coracoideo y la parte interna del sub escapular, evitando hacerlo más dorsal para no seccionar los pulmones.
- i) Se Cortó después la articulación de los huesos coracoides, clavícula y húmero de ambos lados y se retiró la mitad del tórax con todos sus huesos, músculos y articulaciones.
- j) Se extrajo el hígado y bazo para visualizar y poder trabajar con el intestino.

k) Se identificó y se separó las secciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (ciegos y colon)

l) Luego se procedió a diseccionar cada segmento de todo el intestino delgado y grueso y se colocaron en bolsas herméticas debidamente rotuladas.

Figura 8. Necropsia de los pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM)



Figura 9. Separación de los segmentos intestinales de los pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM)



### 3.2.7. Análisis de las muestras.

- ❖ Para el análisis de las muestras de los segmentos del tracto gastrointestinal se procedió a la esterilización del material de vidrio en el horno a una temperatura de 180°C por 60 minutos, 24 horas antes.

Figura 10. Esterilización del material para la preparación de los medios de cultivo bacteriano

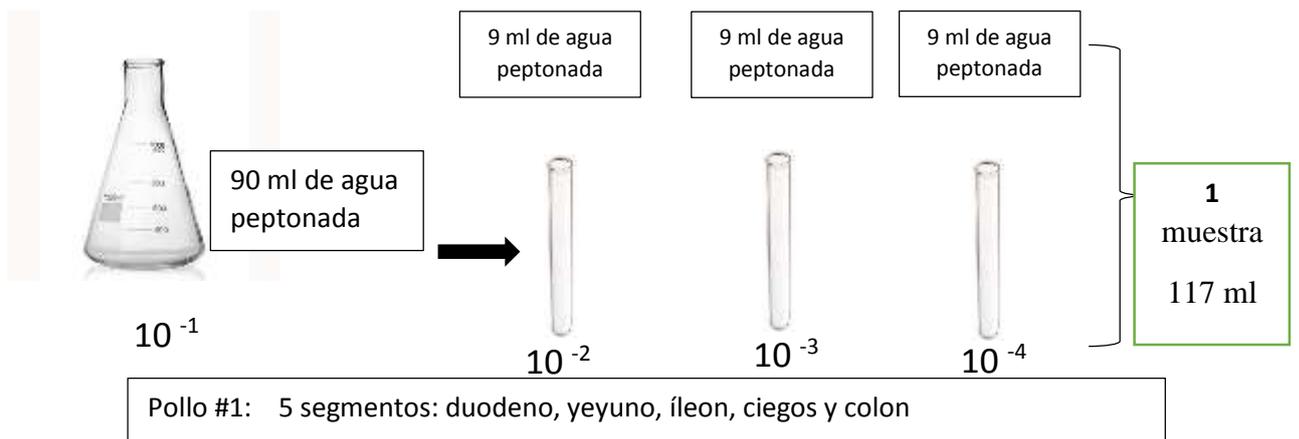


Fuente: Laboratorio de patología clínica UNPRG.

### 3.2.7.1. Preparación de medios de cultivo, según lo establecido por lo sugerido Guerra y Agurto<sup>(127)</sup>

➤ Preparación del agua peptonada 0.1% para las diluciones:

Se pesó 0.1 gr de agar peptona y luego se colocó en 100 ml de agua destilada, luego se homogenizó.



Luego los segmentos del tracto gastrointestinal fueron pesados en una balanza analítica (10 gr) para ser colocados en las primeras diluciones  $10^{-1}$

Figura 11. Pesado de segmentos intestinales



Figura 12. Diluciones  $10^{-1}$  ml de agua peptonada



❖ Luego se colocó 1 ml de la primera dilución  $10^{-1}$  a la dilución  $10^{-2}$  y de esta se volvió a extraer 1 ml para colocar a la tercera dilución  $10^{-3}$ , y luego a la cuarta dilución  $10^{-4}$ .

Figura 13. Extracción de las diluciones en los tubos de ensayo.



➤ **Preparación Agar cromogénico Triptona Bilis X-Glucoronida (TBX) para *Escherichia coli***

Se disolvió 31.6 gr de agar TBX en 1 litro de agua destilada (deshionizada)

Cálculos para el procedimiento:

1 muestra -----> 6 placas

6 placas x 15 ml del agar TBX ya preparado

= 90 ml x muestra

20 pollos X 5 segmentos = 100 muestras

100 X 90 ml = 9000 ml ----> 9 litros

Conclusión: Se preparó 9 litros de agar TBX.

Luego se llevó a la autoclave a 15 lbs de presión por 15 minutos a 121°C

Figura 14. Preparación del agar TBX: Cromogénico



➤ **Preparación del Agar Man Rogosa y Sharpe (MRS) para *Lactobacillus spp***

Se disolvió 62.5 gr de agar MRS en 1 litro de agua destilada (deshionizada)

Cálculos para el procedimiento:

1 muestra -----> 6 placas

6 placas x 15 ml del agar MRS ya preparado = 90 ml x muestra

20 pollos X 5 segmentos = 100 muestras

100 X 90 ml = 9000 ml -----> 9 litros

Conclusión: Se preparó 9 litros de agar MRS.

Luego se llevó a la autoclave a 15 lbs de presión por 15 minutos a 121°C

Figura 15. Preparación del Agar MRS *Lactobacillus*



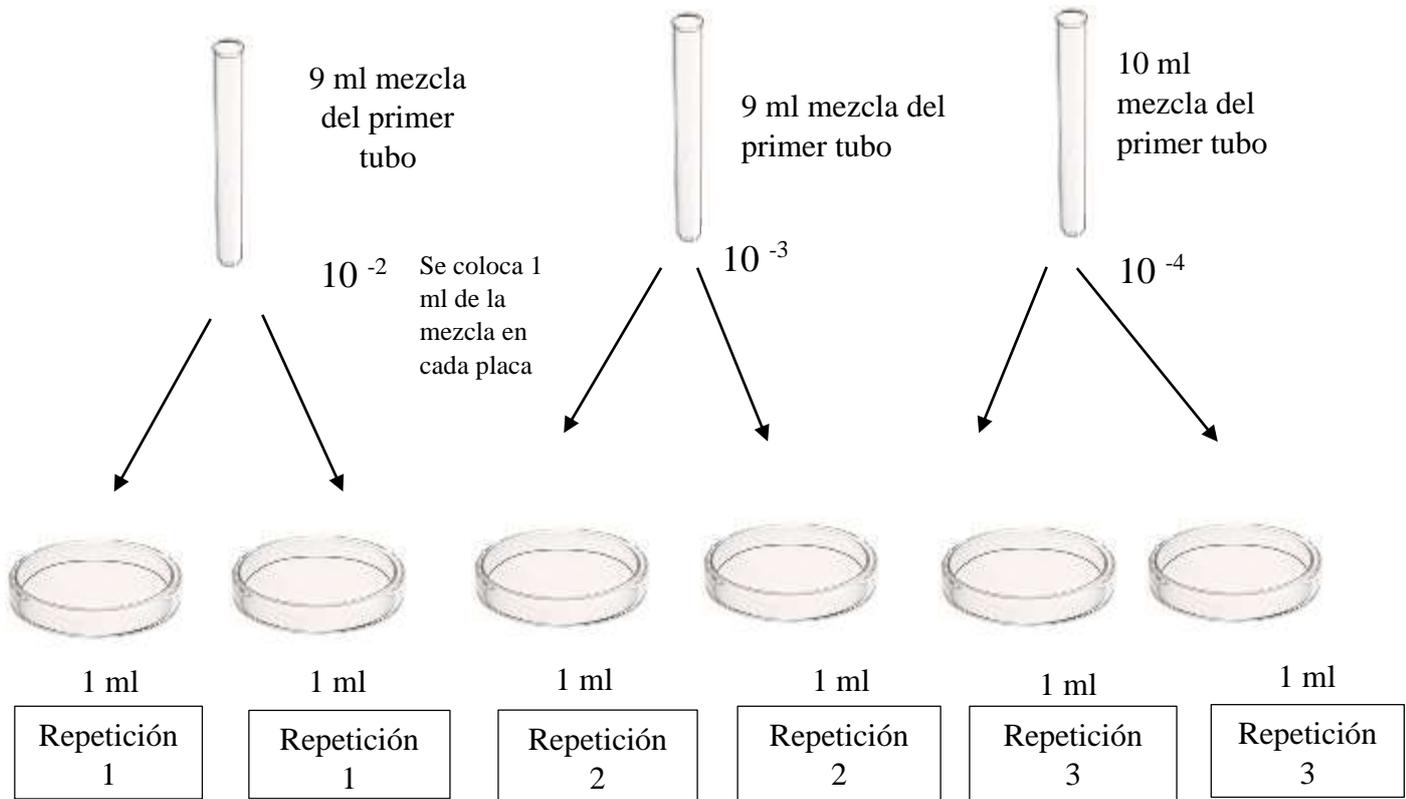
**3.2.7.2. Siembra en masa según lo establecido por Guerra y Agurto<sup>(139)</sup> y se hizo de la siguiente manera:**

Se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en el interior de la masa del agar<sup>(127)</sup>.

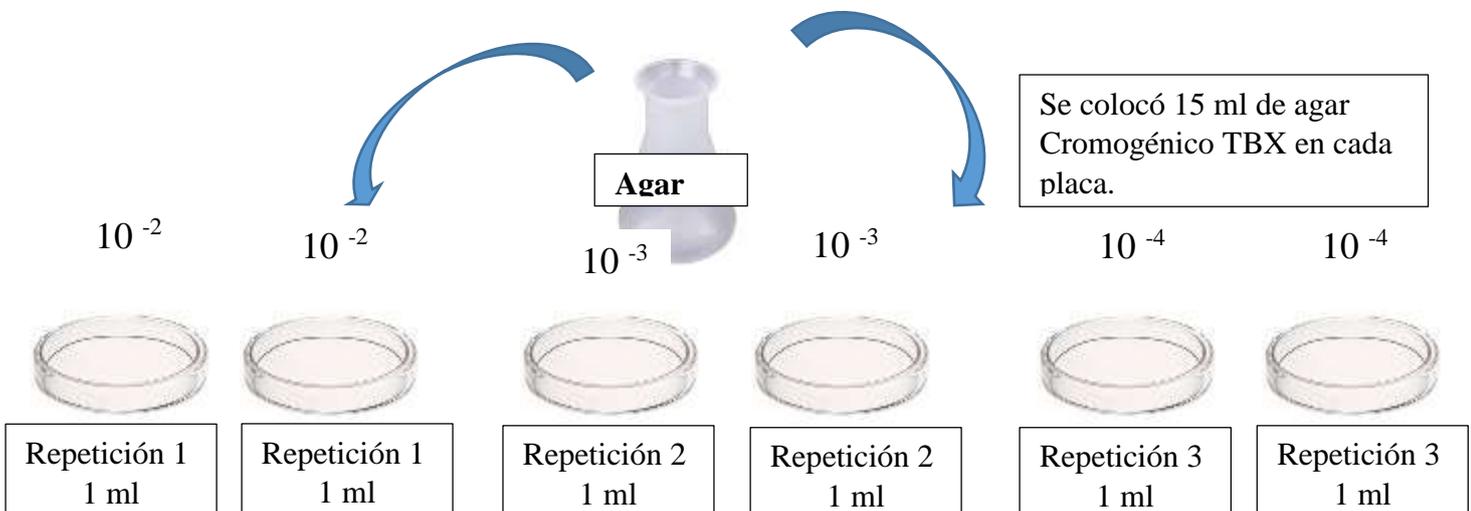
1. Se depositó 1 ml de la muestra o de cada dilución en placas estériles, vacías.
2. Se agregó a cada placa 15 a 20 ml del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y mantenido a unos 74°C.
3. Se agitó moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimientos circulares y de vaivén (siempre sin levantar la placa de la mesa). Con esto se consigue mezclar el inóculo con el agar.
4. Se dejó solidificar el agar a temperatura ambiente (esperar al menos media hora) y se llevan las placas a incubar (la temperatura y el tiempo de incubación elegidos varían según el tipo de microorganismo).
5. Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar).

➤ **Siembra de *Escherichia coli***

Luego: De las diluciones en los tubos de ensayo, luego se colocó 1 ml de cada mezcla con ayuda de la pipeta en las placas: Ejm: Segmento duodeno del pollo #1, Este procedimiento se hará para cada segmento de cada pollo.



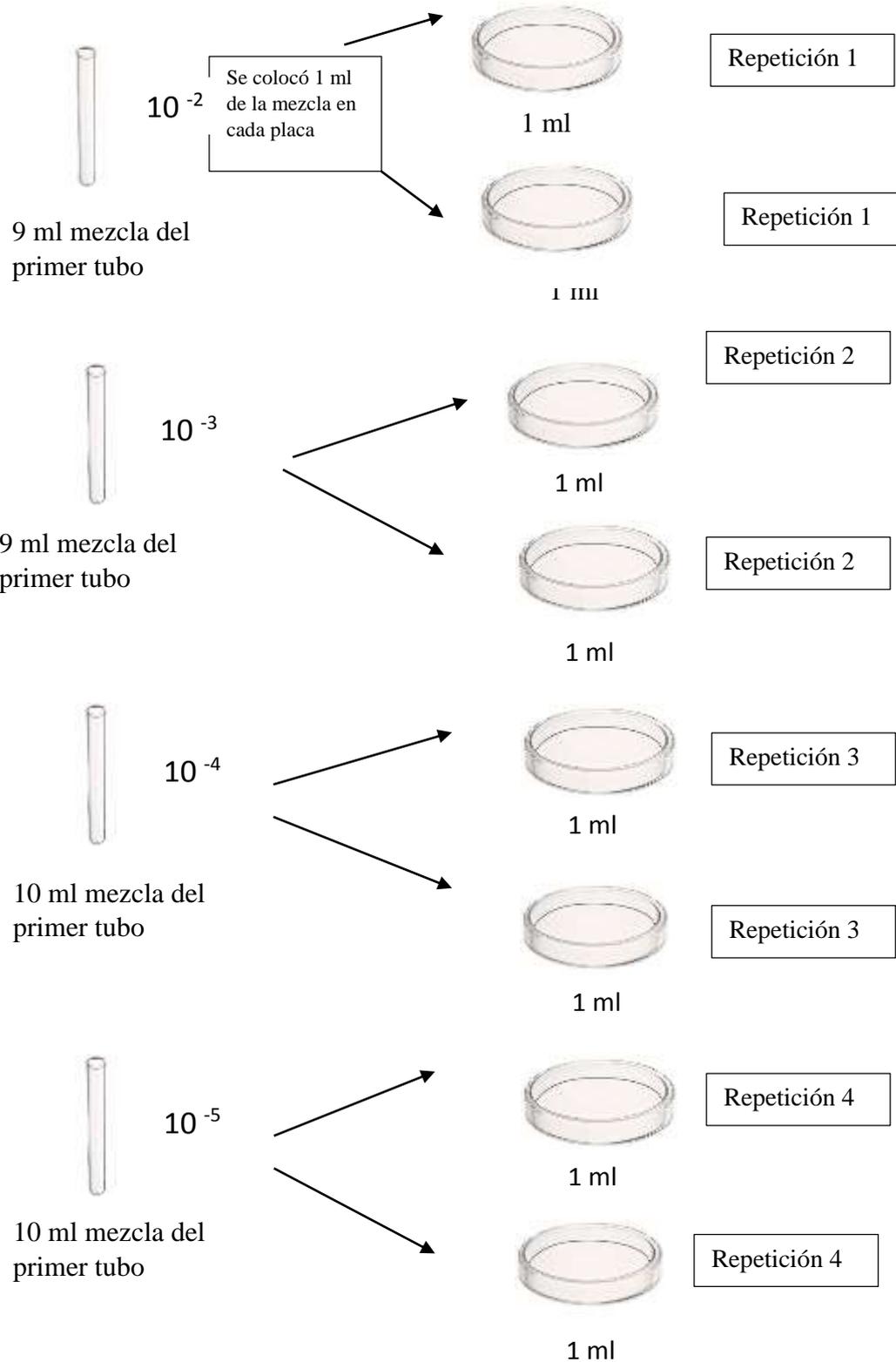
❖ Luego se colocó el agar TBX Cromogénico (técnica sembrado en masa) en las placas, se homogenizo despacio y se dejó que tome una consistencia compacta, para luego colocarlas a la estufa a 45°C por 24 horas.



➤ **Siembra de *Lactobacillus spp***

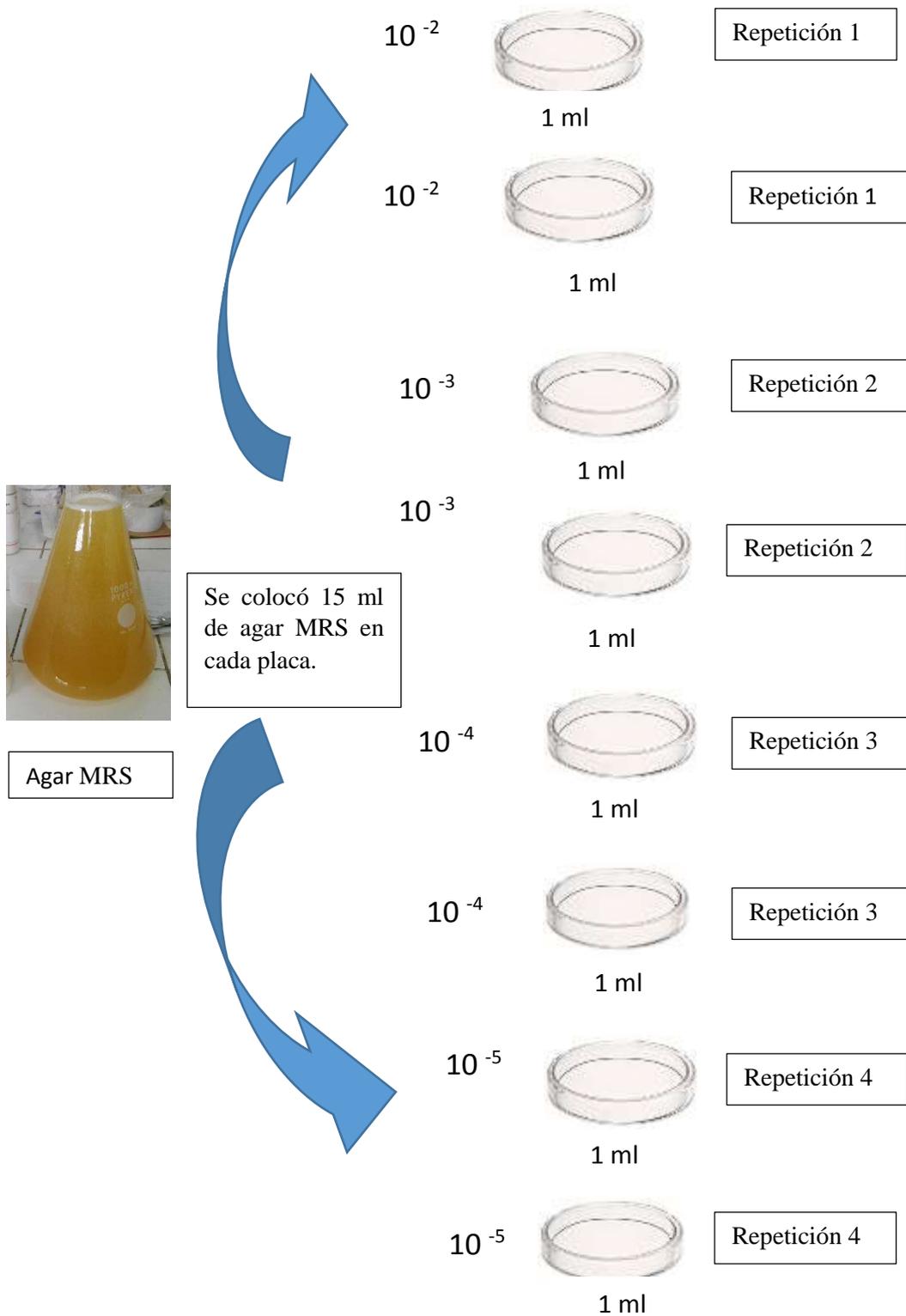
De las diluciones en los tubos de ensayo, luego se colocó 1 ml de cada mezcla con ayuda de la pipeta en las placas:

Ejm: Segmento duodeno del pollo #1



Este procedimiento se hará para cada segmento de cada pollo.

❖ Luego se colocó el agar MRS (técnica de siembra en masa) en las placas, se homogenizo despacio y se dejó que tome una consistencia compacta, para luego colocarlas a la estufa a 37°C por 48 horas.



Estos procedimientos se harán para cada uno de los segmentos de la porción intestinal del número de muestra de pollos a evaluar.

Figura 16. Siembra de *Escherichia coli* y *Lactobacillus spp*



Figura 17. Incubación de *E. coli*



### 3.2.7.3. Técnica de recuento de colonias.

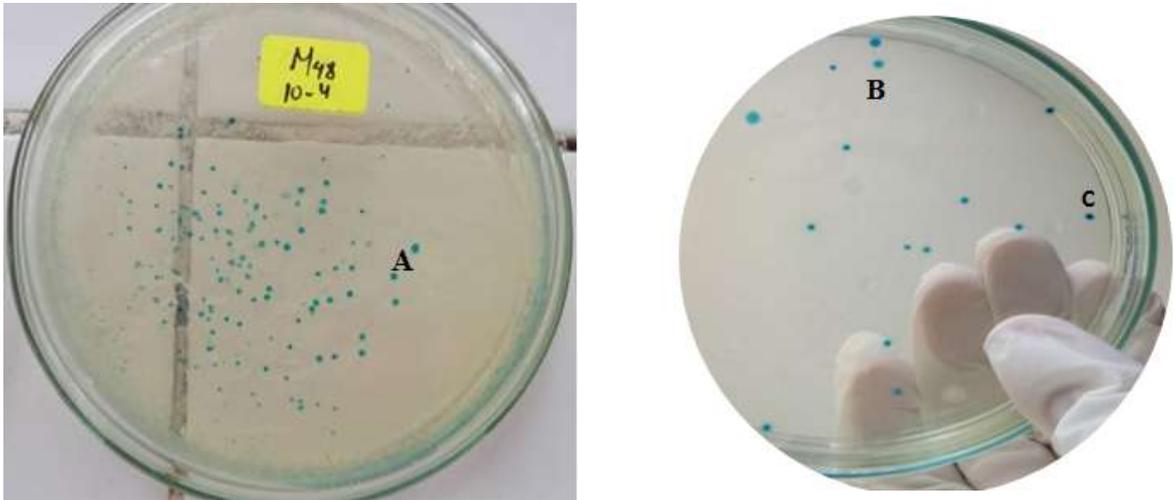
Para realización del contaje, se puso la placa de Petri con la base hacia arriba. El número de unidades formadoras de colonia o UFC/g de la muestra original será:

$$\text{Número de UFC/g} = \text{Número de colonias} \times \text{factor de dilución}$$

Para registro del número de colonias, se eligió la dilución menor (esto proporciona una precisión estadística suficiente).

➤ Para *Escherichia coli*:

Figura 18. Recuento de colonias de *E. coli* del contenido intestinal de pollos Coob.500 en agar cromogénico TBX.



(A,B,C) Colonias de *Escherichia coli* color azul a violeta.

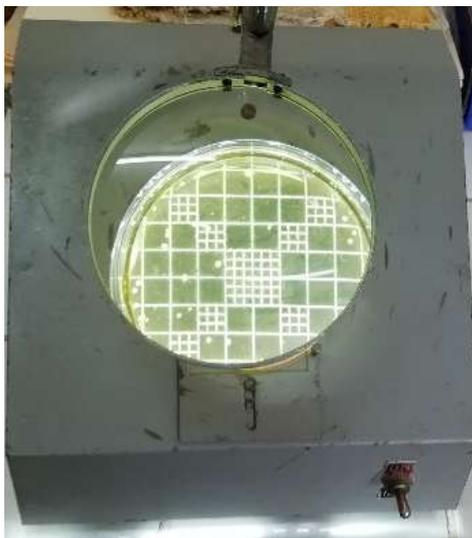
Figura 19. Lectura de placas de *E. coli*



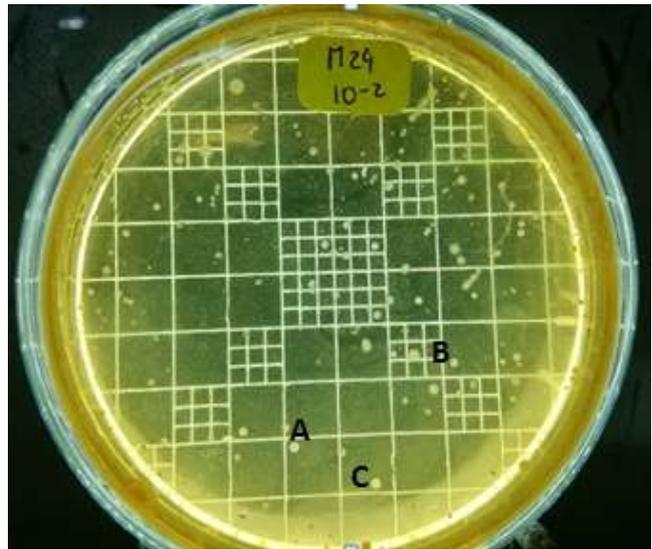
➤ **Para *Lactobacillus* spp**

Las colonias presuntivas de *Lactobacillus* spp crecen de color blanquecinas y presentan una apariencia mucoide o cremosa en este agar. Posteriormente deben identificarse para realizar la cuantificación de las colonias <sup>(127)</sup>.

Figura 20. Recuento de colonias del contenido intestinal de pollos Coob.500 en agar Man Rogosa (M.R.S.)



Lector de colonias



(A,B,C) Colonias de *Lactobacillus* color blanquecinas con apariencia mucoide o cremosa

**3.2.7.4. Prueba de identificación de microorganismos.**

➤ Identificación de *Escherichia coli*

**TSI (Triple Sugar Iron)**

Indicador: rojo de fenol

Ácido (A): amarillo

Alcalino (K): rojo

No inoculado: naranja rojizo (pH: 7.4)

Lectura y resultados:

Lactosa +    ↘  
Sacarosa +   ↗    La bacteria a fermentado estos azucares, el medio ácido producido es suficiente para virar el color del medio a color amarillo

Glucosa +  $\longrightarrow$  La bacteria a fermentado la glucosa, el medio ácido producido en el fondo acidifica el medio en esa zona y se torna de color amarillo

Producción de gas +  $\longrightarrow$  Durante el proceso de fermentación se observan burbujas o ruptura del agar.

Controles	Columna vertical (fondo)	Superficie inclinada (pico flauta)
<i>E. coli</i> A/A Lactosa + Sacarosa + Glucosa + Producción de gas +	Amarillo/gas	Amarillo

Figura 21. Lectura de *E. coli* en TSI



Antes del sembrado



TSI: Lactosa + /Sacarosa +/  
Glucosa +/ Producción de gas +

### LIA (Agar Lisina Hierro)

Indicador: purpura de bromocresol

Ácido (A): color amarillo (pH: 5.2)

Alcalino (K): color purpura (pH: 6.8)

No inoculado: purpura intenso brillante (pH: 6.0)

Lectura y resultados:

Lisina +  $\longrightarrow$  descarboxilación oxidativa de la lisina.

Controles	Columna vertical (fondo)	Superficie inclinada (pico flauta)
<i>E. coli</i> K/A (no hay diseminación de la Lisina) Negativo en la producción de ácido sulfhídrico.	Amarillo	Purpura

Figura 22. Prueba de identificación LIA (Lisina +)



### Agar Citrato de Simmons

Indicador: azul de bromotimol pH: 6

Alcalino: color azul de Prusia intenso pH: 7.6

No hay crecimiento: color verde pH: 6.9

Lectura y resultados:

Citrato - → No se observa crecimiento de la bacteria, ni cambio en el pH.  
Color verde

Controles	Columna vertical (fondo)	Superficie inclinada (pico flauta)
<i>E. coli</i> Citrato -	Verde	Verde

Figura 23. Citrato de Simmons: Citrato -



### Caldo Glucosado

Lectura y resultados:

❖ Prueba de Rojo de metileno (RM):

RM + → Se coloca 2 gotas de rojo de metileno y la reacción se torna rojizo

❖ Prueba de Vorges-Proskauer (VP):

VP - → Mantiene su color.

Controles: <i>E. coli</i>	Tubo
RM +	Color rojizo
VP -	Mantiene su color

Figura 24. Lectura de Caldo Glucosado



Prueba del Indol (agua peptona y reactivo de Kovacs)

Reactivo de Kovacs: Está diseñado para la demostración de producción de indol por bacterias que poseen una triptofanasa (bacterias Gram (-), especialmente Enterobacteriaceae (*E.coli*))

Técnica: Se incuba a 37°C durante 24 horas y tras la incubación, añadimos unas gotas de reactivo de Kovacs. Si se ha producido indol aparecerá un anillo de color rojizo en la superficie del caldo de cultivo <sup>(127)</sup>.

Indol + → se observa un anillo color rojizo en la parte superior

Controles: <i>E. coli</i>	Tubo
Indol +	Formación anillo rojizo en la parte superior.

Figura 25. Prueba del Indol



### ➤ Identificación de *Lactobacillus* spp

Los lactobacilos son muy exigentes nutricionalmente, debido a que necesitan factores de crecimiento <sup>(127)</sup>

Preparación para pruebas bioquímicas de *lactobacillus*:

- Disolver 55 gr de caldo MRS para 1 litro de agua destilada.
- Caldo MRS + Cloruro de sodio 2%  
Disolver 2gr de cloruro de sodio en 100 ml de caldo MRS y luego vertir 8 ml en cada tubo (20 tubos).
- Caldo MRS + Cloruro de sodio 4%

Disolver 4gr de cloruro de sodio en 100 ml de caldo MRS y luego verter 8 ml en cada tubo (20 tubos).

- Caldo MRS + Glucosa 1%
- Caldo MRS + Lactosa 1%
- Caldo MRS + Sacarosa 1%
- Caldo MRS + Manitol 1%
- Caldo MRS + Arabinosa 1%

Disolver 1 gr de glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, arabinosa en 100 ml de caldo MRS cada azúcar y luego verter 8 ml en cada tubo (20 tubos).

Pruebas:

- Tubo con caldo MRS con NaCl 2%
- Tubo con caldo MRS con NaCl 4%

Resultados: Pruebas de tolerancia a la sal

- Tubo con caldo MRS con glucosa
- Tubo con caldo MRS con lactosa
- Tubo con caldo MRS con sacarosa
- Tubo con caldo MRS con manitol
- Tubo con caldo MRS con arabinosa

Figura 26. Identificación de *Lactobacillus spp*



Antes del sembrado



Después del sembrado

Resultado:

- ✓ Glucosa +
- ✓ Lactosa +
- ✓ Sacarosa +
- ✓ Manitol +
- ✓ Arabinosa +



Se observó Turbidez en los medios, esto se debe a que *lactobacillus spp* tiene como característica fermentar glucosa, lactosa, sacarosa, arabinosa, manitol.

### **3.3. MÉTODO ESTADÍSTICO**

Los datos fueron sometidos a análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar. La prueba de Duncan (1995) se utilizó para la comparación de medias, utilizando el programa SPSS versión 22.0 paquete estadístico.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. *Escherichia coli*

Tabla 5. *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de mango en el día 7.

Tracto Gastrointestinal	Niveles de Harina de Semilla de Mango (%)			
	0	10	25	50
Duodeno	73.00±1.00 <sup>a</sup>	58.40±2.30 <sup>b</sup>	34.40±7.96 <sup>d</sup>	46.20±4.02 <sup>c</sup>
Yeyuno	73.20±1.92 <sup>a</sup>	63.00±3.16 <sup>b</sup>	35.40±6.88 <sup>d</sup>	50.00±6.56 <sup>c</sup>
Íleon	74.60±3.20 <sup>a</sup>	62.80±6.87 <sup>b</sup>	33.40±5.27 <sup>d</sup>	49.20±5.59 <sup>c</sup>
Ciegos	83.60±1.82 <sup>a</sup>	61.40±2.70 <sup>b</sup>	36.20±3.03 <sup>d</sup>	49.20±5.93 <sup>c</sup>
Colon	85.00±3.32 <sup>a</sup>	70.80±10.73 <sup>b</sup>	42.20±4.66 <sup>d</sup>	55.60±6.23 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en la misma fila difieren a  $p < 0.01$ .

La tabla 5 muestra el efecto de la harina de semilla de mango (HSM) para evaluar su poder antibacteriano contra de *Escherichia coli* en pollos Cobb 500 al séptimo día, observando una disminución altamente significativa ( $p < 0.01$ ) de *E. coli* en los segmentos intestinales del duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon de pollos alimentados con el 25% HSM con respecto a los demás grupos experimentales (0%, 10% y 50% HSM); entendiéndose que en esta fase productiva (inicio) se encuentra el mayor porcentaje de microbiota dentro de la cual se halla *E. coli* como lo señala concordando con Pedroso *et al.*,<sup>(79)</sup> debido a que la colonización en pollos jóvenes se da a través de la alimentación siendo expuestos después de la primera semana contribuyendo de esta forma la evolución de la microbiota intestinal de las aves; que representan entre el 60 y el 90% de la microbiota intestinal<sup>(128)</sup>; siendo la *E. Coli*, una de las bacterias más importantes en la avicultura perteneciente al grupo de los Gram negativo<sup>(41,42)</sup>, generando cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial<sup>(43)</sup>, es por ello que en esta investigación al alimentarse los pollos con HSM al 25% se obtuvo la reducción de colonias de *E. coli* en todos los segmentos del intestino; debido a los polifenoles componente principal de la HSM<sup>(8)</sup>, estudios ratifican que el extracto de semilla de

mango contiene gran cantidad de polifenoles (79.5% mg / 100 mg seco húmedo) dándole el poder antibacteriano más efectivo sin embargo contra las bacterias del ácido láctico es inefectiva<sup>(107)</sup>. Los principales compuesto más estudiados son la galanginina<sup>(10)</sup> y catequinas<sup>(8)</sup> siendo su mecanismo de acción inhibir el ADN girasa de células bacterianas, además de inhibir la enzima topoisomerasa IV<sup>(9)</sup>; estas actividades mencionadas no pueden atribuirse a la presencia de una sola molécula del fruto, sino a la acción conjunta compuestos fenólico que ejercen efectos sinérgicos, formando un fitocomplejo activo en la inhibición microbiana, concordando con Denny *et al.*,<sup>(10)</sup>

Tabla 6. *Escherichia coli* (10<sup>4</sup> UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 23.

Tracto Gastrointestinal	Niveles de Harina de Semilla de Mango (%)			
	0	10	25	50
Duodeno	73.20±1.92 <sup>a</sup>	57.60±2.07 <sup>b</sup>	35.40±3.85 <sup>d</sup>	48.80±2.77 <sup>c</sup>
Yeyuno	73.80±1.48 <sup>a</sup>	57.40±1.14 <sup>b</sup>	35.20±3.11 <sup>d</sup>	50.00±2.92 <sup>c</sup>
Íleon	75.20±2.17 <sup>a</sup>	54.00±3.54 <sup>b</sup>	29.80±3.96 <sup>d</sup>	45.40±3.65 <sup>c</sup>
Ciegos	84.60±1.14 <sup>a</sup>	61.00±3.16 <sup>b</sup>	35.60±4.04 <sup>d</sup>	51.20±3.96 <sup>c</sup>
Colon	87.20±1.30 <sup>a</sup>	66.00±3.16 <sup>b</sup>	40.40±3.85 <sup>d</sup>	56.40±2.70 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a p<0.01.

El desarrollo de la microbiota intestinal en aves se da a partir de la fase de crecimiento provocando una biodiversidad en el ecosistema macrobiótico intestinal. Sin embargo, el uso de antibióticos ha mostrado ser perjudicial en el desarrollo de la microbiota intestinal, desarrollando cambios severos en la composición de la misma<sup>(19)</sup>. Si bien es cierto Según Lu *et al.*,<sup>(31)</sup> la población bacteriana más abundante en el intestino delgado es el género *Lactobacillus* con 68,5% del total, mientras que el 2,5% se corresponde con la familia de las *Proteobacteriaceae* (*Echerichia coli*); en comparación con el intestino grueso el grupo más abundante le pertenece a la familia *Clostridiaceae*, en un 60% y el 10% le corresponde a bacterias Gram negativas y de ellas el 2,8% a la familia *Proteobacteriaceae* (*Echerichia coli*); en esta investigación se redujo (p<0.01) la cantidad *Echerichia coli* en los diferentes segmentos intestinales: Duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon (Tabla 6) al incluir en la dieta de las aves el 25% HSM con respecto a los demás grupos experimental (0, 10, y 50% HSM), demostrando que la semilla de mango tiene poder antibacteriano gracias a sus compuestos fenólicos mencionados los

cuales presenta actividades que van desde inhibidoras de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasas, ATP-asas, liasas, hidroxilasas, transferasas, oxidorreductasas y cinasas), hasta acción antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana y antiviral<sup>(116)</sup>. Como también es referido por estudios realizados por Mori *et al.*,<sup>(117)</sup> que el anillo B de los flavonoides desempeña un papel en el enlace de hidrógeno con el apilamiento de las bases de ácido nucleico y que esto puede explicar la acción inhibitoria sobre la síntesis de ADN y ARN bacterianos. Otras investigaciones reportada por Plaper *et al.*,<sup>(118)</sup> informaron que el componente fenólico “Quercetina” se une a la subunidad GyrB de la girasa del ADN de *E. coli* inhibiendo la actividad ATPasa de la enzima, siendo esta la responsable de la actividad antibacteriana. Otro grupo de investigadores, Ikigai *et al.*,<sup>(119)</sup> llevaron a cabo una investigación sobre el efecto de los fenoles encontrando que el Galato de Epigallocatequina, actúan principalmente y dañan las membranas bacterianas perturbando las bicapas lipídicas al penetrarlas directamente e interrumpir la función de barrera, además causan un proceso que provoca la fuga de materiales intramembranosos.

Tabla 7. *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 42.

Tracto	Niveles de Harina de Semilla de Mango (%)			
	0	10	25	50
Gastrointestinal				
Duodeno	78.40±4.56 <sup>a</sup>	39.00±2.74 <sup>b</sup>	14.40±3.51 <sup>d</sup>	29.20±2.95 <sup>c</sup>
Yeyuno	79.00±1.58 <sup>a</sup>	39.60±3.05 <sup>b</sup>	17.20±1.92 <sup>d</sup>	29.40±3.91 <sup>c</sup>
Íleon	82.40±3.91 <sup>a</sup>	36.20±3.03 <sup>b</sup>	12.40±1.52 <sup>d</sup>	22.20±7.26 <sup>c</sup>
Ciegos	87.20±1.92 <sup>a</sup>	39.80±3.03 <sup>b</sup>	15.80±2.86 <sup>d</sup>	28.80±1.92 <sup>c</sup>
Colon	88.60±4.16 <sup>a</sup>	45.60±2.61 <sup>b</sup>	20.40±4.16 <sup>d</sup>	33.80±4.15 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a  $p < 0.01$ .

Al término de la fase engorde (42 días) se siguió evaluando el efecto antimicrobiano de la harina de semilla de mango (HSM) (Tabla 7) observando la misma tendencia en cuanto a la disminución ( $p < 0.01$ ) de la población de *Escherichia coli* en los diferentes segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, íleon, ciegos y colon) en pollos Cobb 500 al incluir en la dieta 25% HSM, evidenciándose el poder antibacteriano en toda la fase

productiva de los pollos Cobb 500, gracias al sinergismo de los compuestos fenólicos presentes en la semilla de mangos antes mencionado.

#### 4.2. *Lactobacillus spp*

Tabla 8. *Lactobacillus spp* ( $10^5$  UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 7.

Tracto	Niveles de Harina de Semilla de Mango (%)			
	0	10	25	50
Gastrointestinal				
Duodeno	10.40±1.14 <sup>d</sup>	16.80±0.84 <sup>c</sup>	21.40±1.14 <sup>a</sup>	18.60±1.14 <sup>b</sup>
Yeyuno	15.60±1.52 <sup>d</sup>	21.80±1.79 <sup>c</sup>	27.20±0.84 <sup>a</sup>	25.00±1.00 <sup>b</sup>
Ileon	20.00±1.00 <sup>d</sup>	26.40±1.14 <sup>c</sup>	34.20±1.79 <sup>a</sup>	30.60±1.14 <sup>b</sup>
Ciegos	3.80±1.30 <sup>d</sup>	10.00±1.00 <sup>c</sup>	13.60±1.14 <sup>a</sup>	11.60±1.14 <sup>b</sup>
Colon	1.40±0.55 <sup>d</sup>	4.40±1.14 <sup>c</sup>	8.60±0.55 <sup>a</sup>	6.20±0.84 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a  $p < 0.01$ .

La evaluación de *Lactobacillus spp* al séptimo día de vida en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM) (Tabla 8) se encontró que los segmentos intestinales del duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon de pollos alimentados con el 25% HSM tuvo una aumento altamente significativo en la población de *Lactobacillus spp* con respecto a los demás grupos experimentales (0, 10 y 50% HSM); esto se debe a que las semillas de mango no es efectiva contra bacterias ácido lácticas tal como lo reporto Kabuli *et al.*,<sup>(107)</sup> al evaluar el poder antibacteriano del extracto de semillas de mango.

*Lactobacillus spp.*, es uno de los microorganismo que más abunda en la microbiota intestinal representando el 60 y 90% del total de la microbiota intestinal<sup>(128)</sup>; y es considerado en el grupo de bacterias benéficas<sup>(32)</sup>. Su aumento poblacional se debe al aporte de carbohidratos, aminoácidos por parte de la semilla de mango que le proporcionan un alto aporte nutricional que requieren para su crecimiento tal como lo indica Cástulo<sup>(63)</sup> y Gómez<sup>(61)</sup> que las bacterias lácticas necesitan para su desarrollo y establecimiento en la microbiota intestinal, gran cantidad de carbohidratos como fuente de energía, para la producción de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico y láctico)<sup>(129)</sup>; este último producto lo obtiene de la fermentación de los azúcares como; glucosa y lactosa por la vía glucólisis y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO<sub>2</sub> por la vía del ácido-6- Fosfogluconico, el

ácido butírico también producido por *Lactobacillus* spp estimula la proliferación celular, regula la apoptosis y contribuye a mantener la integridad de la pared intestinal tal como lo señala Huda-Faujan *et al.*,<sup>(129)</sup>; por lo que este tipo de bacterias juega un papel importante en la absorción de nutrientes, detoxificación de ciertos compuestos, crecimiento y protección contra bacterias patógenas<sup>(24)</sup>.

Tabla 9. *Lactobacillus* spp ( $10^5$  UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 23.

Tracto Gastrointestinal	Niveles de Harina de Semilla de Mango (%)			
	0	10	25	50
Duodeno	10.80±0.84 <sup>d</sup>	17.60±1.14 <sup>c</sup>	21.60±1.14 <sup>a</sup>	19.60±1.14 <sup>b</sup>
Yeyuno	16.20±1.30 <sup>d</sup>	23.60±1.14 <sup>c</sup>	28.00±1.00 <sup>a</sup>	25.40±1.14 <sup>b</sup>
Íleon	20.80±1.30 <sup>d</sup>	27.80±1.30 <sup>c</sup>	35.80±1.30 <sup>a</sup>	31.60±1.51 <sup>b</sup>
Ciegos	4.40±1.14 <sup>d</sup>	11.00±1.00 <sup>c</sup>	14.20±0.84 <sup>a</sup>	13.40±0.89 <sup>b</sup>
Colon	1.60±0.55 <sup>d</sup>	4.40±1.52 <sup>c</sup>	8.20±0.84 <sup>a</sup>	6.40±0.89 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a  $p < 0.01$ .

En la tabla 9 ratificamos lo reportado por Cressman *et al.*,<sup>(83)</sup> que en la etapa productiva de crecimiento, la microbiota en el íleon en aves está dominada principalmente por *Lactobacillus* spp, en esta investigación el día 23 los pollos Cobb 500 alimentado con el 25% HSM, obtuvo la mayor población ( $p < 0.01$ ) de *Lactobacillus* spp con respecto a los demás grupos experimentales (Tabla 9), observando también que en el intestino delgado se encontró mayor cantidad de *Lactobacillus* spp; resultados que se ratifica a lo reportado por Nakphichit *et al.*,<sup>(84)</sup> y Salanitro *et al.*,<sup>(85)</sup> que señalan el *Lactobacillus* spp es el microorganismo más abundante en el intestino delgado cuya diversidad aumentó de 21 a 42 días de edad, así como también Dumonceaux *et al.*,<sup>(87)</sup> encontrando aproximadamente que el 90% de la microbiota del intestino delgado de pollos está compuesta por *Lactobacillus* spp.

En esta investigación también se encontró que en el intestino delgado tanto las porciones de yeyuno e íleon fueron los que se encontraron mayor población ( $p < 0.01$ ) de *Lactobacillus* spp con respecto al duodeno, asegurando lo investigado por Lu *et al.*,<sup>(31)</sup> que el 70% de las secuencias del íleon eran *Lactobacillus* spp.; resultado valioso debido a que el intestino delgado es la principal zona de digestión y absorción de nutrientes y la mayor población *Lactobacillus* spp. podría contribuir excepcionalmente a los procesos digestivos<sup>(69)</sup>, tanto en la biodisponibilidad y absorción, mejorando de esta forma el rendimiento productivo de las aves.

Sin embargo en el intestino grueso conformado por el ciego y colon se observó una población reducida de *Lactobacillus* spp con respecto al intestino delgado (Tabla 13), esto ratifica a lo reportado por Lu *et al.*,<sup>(31)</sup> que el género *Lactobacillus* spp en el intestino grueso representan el 25% del total. En esta investigación el tracto del intestino grueso se observó que el grupo con el 25% HSM tuvo un incremento ( $p<0.01$ ) de la población de *Lactobacillus* spp en los segmentos tanto del ciego como el colon en comparación con los demás grupos.

Tabla 10. *Lactobacillus* spp ( $10^5$  UFC/g) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango en el día 42.

Tracto	Niveles de Harina de Semilla de Mango (%)			
	0	10	25	50
Gastrointestinal				
Duodeno	12.00±1.00 <sup>c</sup>	19.40±0.55 <sup>b</sup>	23.00±1.00 <sup>a</sup>	20.40±0.55 <sup>b</sup>
Yeyuno	19.20±1.30 <sup>d</sup>	28.40±0.55 <sup>c</sup>	32.80±0.84 <sup>a</sup>	29.80±0.84 <sup>b</sup>
Ileon	25.20±1.30 <sup>d</sup>	33.40±0.55 <sup>c</sup>	39.00±1.00 <sup>a</sup>	36.00±1.00 <sup>b</sup>
Ciegos	6.40±1.14 <sup>d</sup>	11.60±0.55 <sup>c</sup>	15.40±0.89 <sup>a</sup>	13.20±0.84 <sup>b</sup>
Colon	1.60±0.55 <sup>d</sup>	6.40±0.55 <sup>c</sup>	9.20±0.84 <sup>a</sup>	7.60±0.55 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en la misma fila difieren a  $p<0.01$ .

A los 42 días de edad los pollos se sacrificaron y se observó el mismo comportamiento con respecto a los 21 días, es decir hubo un incremento ( $p<0.01$ ) en la población de *Lactobacillus* spp. en el intestino delgado con respecto al intestino grueso, y las porciones de ciego y colon muestran un aumento ( $p<0.01$ ) en el grupo de pollos alimentados con el 25% HSM (Tabla 10), resultado de mucha importancia ya que un incremento de bacterias benéficas como el *Lactobacillus* spp. influye directamente en el comportamiento productivo y además inhibe ciertos patógenos oportunistas (*E. coli*), tal como lo señalan los autores ya mencionados.

Tabla 11. *Lactobacillus* spp ( $10^5$  UFC/g) y *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g) en el intestino delgado de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM).

Días	Mircoorganismos	Niveles de harina de semilla de mango (%)			
		0	10	25	50
Siete	<i>Lactobacillus</i> sp	15.33±4.22 <sup>c</sup>	21.67±4.24 <sup>b</sup>	27.60±5.55 <sup>a</sup>	24.73±5.18 <sup>ab</sup>
	<i>E. coli</i>	79.93±3.79 <sup>a</sup>	61.40±4.76 <sup>b</sup>	34.40±6.34 <sup>d</sup>	48.47±5.36 <sup>c</sup>
Veintitrés	<i>Lactobacillus</i> sp	15.93±4.37 <sup>c</sup>	23.00±4.47 <sup>b</sup>	28.47±6.10 <sup>a</sup>	25.53±5.21 <sup>ab</sup>
	<i>E. coli</i>	73.87±2.23 <sup>a</sup>	56.33±2.85 <sup>b</sup>	33.47±4.32 <sup>d</sup>	48.06±3.53 <sup>c</sup>
Cuarenta y dos	<i>Lactobacillus</i> sp	18.80±5.69 <sup>b</sup>	27.07±6.02 <sup>a</sup>	31.60±6.87 <sup>a</sup>	28.73±6.68 <sup>a</sup>
	<i>E. coli</i>	73.80±1.93 <sup>a</sup>	38.27±3.13 <sup>b</sup>	14.67±3.06 <sup>d</sup>	26.93±5.82 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a  $p < 0.01$ .

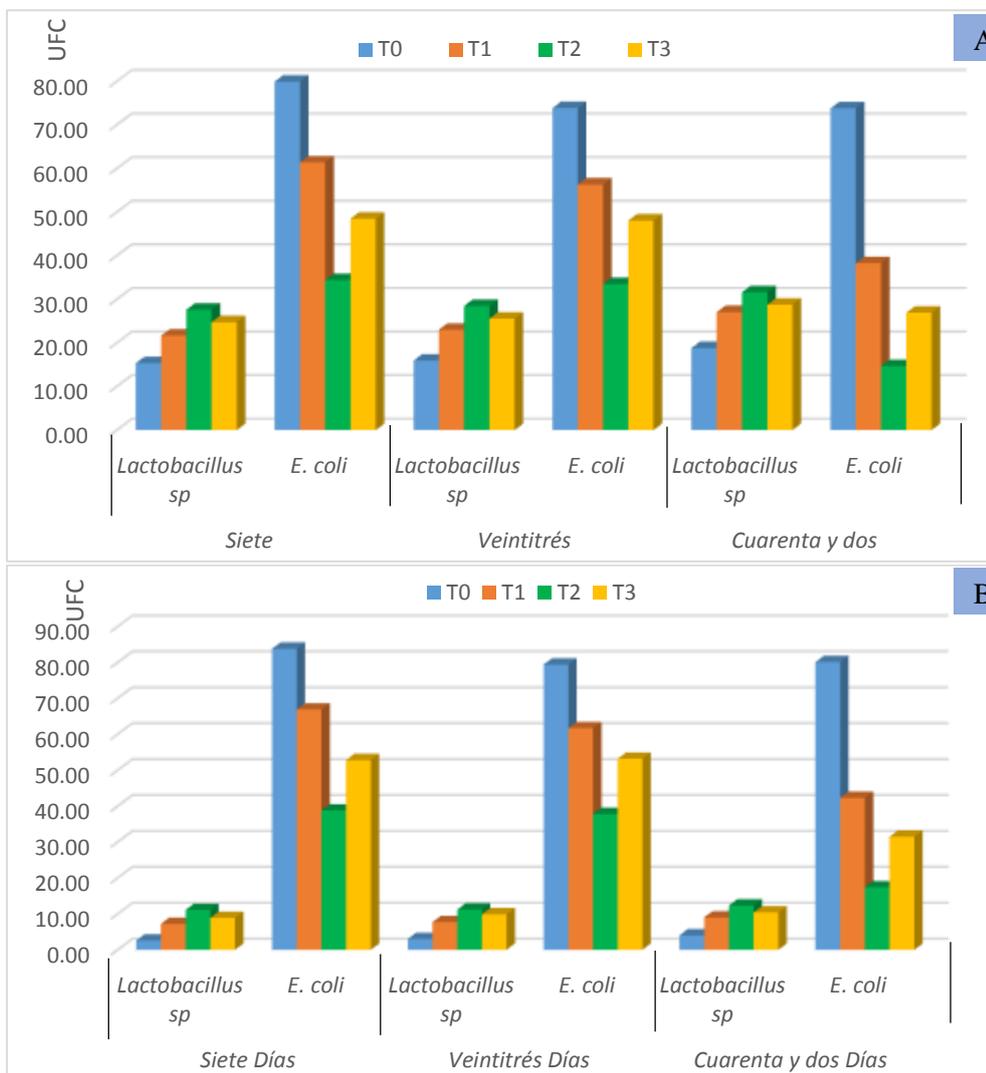
Tabla 12. *Lactobacillus* spp ( $10^5$  UFC/g) y *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g) en el intestino grueso de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM).

Días	Mircoorganismos	Niveles de harina de semilla de mango (%)			
		0	10	25	50
Siete	<i>Lactobacillus</i> sp	2.60±1.58 <sup>c</sup>	7.20±3.12 <sup>b</sup>	11.10±2.77 <sup>a</sup>	8.90±2.99 <sup>ab</sup>
	<i>E. coli</i>	87.90±3.14 <sup>a</sup>	66.10±8.89 <sup>b</sup>	39.20±4.87 <sup>d</sup>	52.40±6.65 <sup>c</sup>
Veintitrés	<i>Lactobacillus</i> sp	3.00±1.70 <sup>c</sup>	7.70±3.68 <sup>b</sup>	11.20±3.26 <sup>a</sup>	9.90±3.78 <sup>ab</sup>
	<i>E. coli</i>	84.80±2.35 <sup>a</sup>	63.50±3.98 <sup>b</sup>	38.00±4.50 <sup>d</sup>	53.80±4.21 <sup>c</sup>
Cuarenta y dos	<i>Lactobacillus</i> sp	4.00±2.67 <sup>c</sup>	9.00±2.79 <sup>b</sup>	12.30±3.37 <sup>a</sup>	10.40±3.03 <sup>ab</sup>
	<i>E. coli</i>	85.40±2.41 <sup>a</sup>	42.70±4.06 <sup>b</sup>	18.10±4.15 <sup>d</sup>	31.30±4.03 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a  $p < 0.01$ .

La tabla 11 y figura 27 muestra que en el intestino delgado la disminución ( $p < 0.01$ ) de *E. coli* en el grupo de pollos alimentados con el 25% HSM con respecto a los demás grupos experimental (0%, 10% y 50% HSM), sin embargo para las colonias de *Lactobacillus* spp hubo un aumento ( $p < 0.01$ ); es decir a medida que aumenta *Lactobacillus* spp disminuye las colonias de *E. coli*, por lo que es importante para la salud intestinal de las aves, tal como lo sugiere los demás autores ya mencionados que respaldan nuestros resultados.

Figura 27. *Lactobacillus* spp ( $10^5$  UFC/g) y *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g) en el tracto gastrointestinal (Intestino delgado y grueso) de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM).



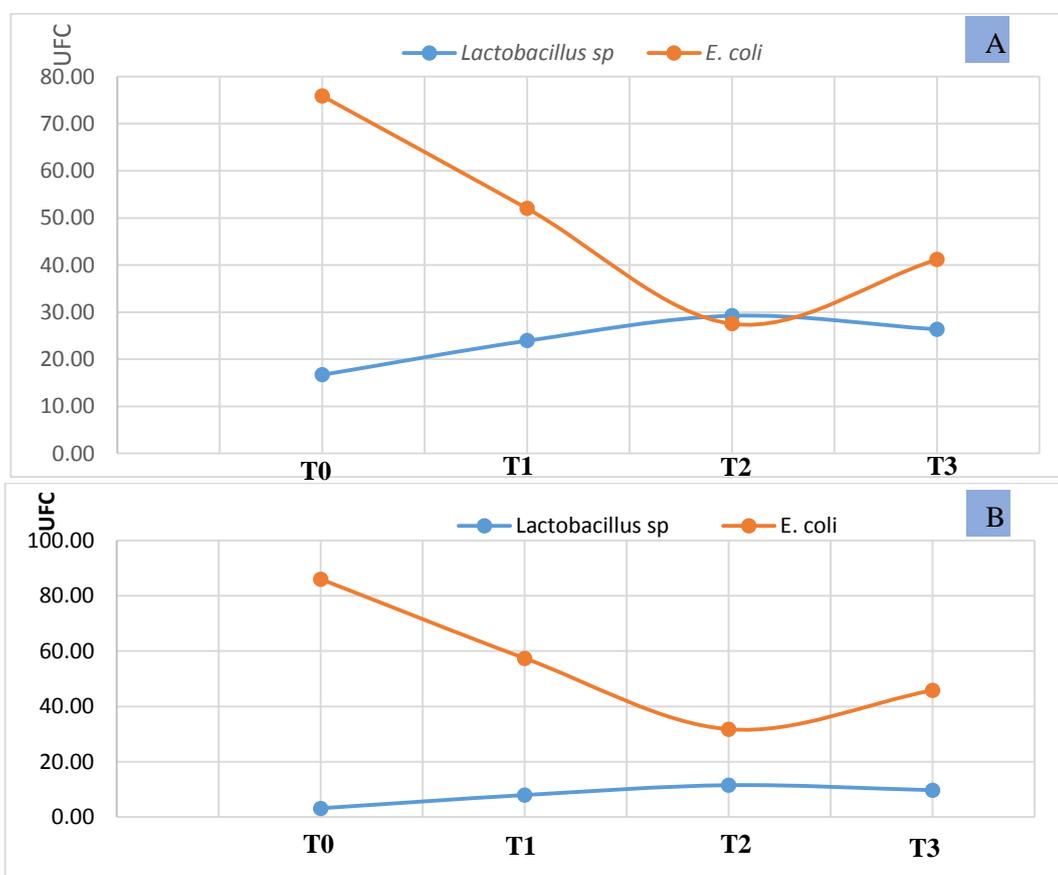
A= Intestino delgado, B= Intestino grueso

T0= 0% de harina de semilla de mango, T1=10% de harina de semilla de mango, T2=25% de harina de mango, T3=50% de harina de mango

La harina de semilla de mango (HSM) se observó que tienen un efecto inhibitorio en la población de *Escherichia coli* pero no en la población de *Lactobacillus* spp, al relacionar dichas poblaciones observamos un antagonismo entre estas dos bacterias, es decir que al aumentar la población de *Lactobacillus* spp disminuye la de *Escherichia coli* como lo muestra la figura 28. Los pollos al recibir el 25% HSM en su dieta logro una mayor población ( $p < 0.01$ ) de *Lactobacillus* spp y una menor población ( $p < 0.01$ ) de *Escherichia coli* ( $p < 0.01$ ), debido a que las bacterias ácido lácticas presentan actividad antagónica secretando sustancias como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, esta última es el que le da el poder antimicrobiano<sup>(63)</sup>; investigaciones diversas respaldan lo

encontrado, como por ejemplo Ruiz *et al.*,<sup>(60)</sup> observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7, de igual manera Vasek *et al.*,<sup>(66)</sup> encontró una disminución de la población de microorganismos siendo las bacteriocinas más estudiadas y la responsable del poder antimicrobiano del *Lactobacillus spp*, la “Nisina” causante de la eliminación de microorganismos patógenos importantes para la avicultura<sup>(130)</sup>; ante ello queda demostrado la eficacia de la inclusión del 25% HSM en la dieta de las aves.

Figura 28. Comportamiento de *Lactobacillus spp* ( $10^5$  UFC/g) y *Escherichia coli* ( $10^4$  UFC/g) en el tracto gastrointestinal (intestino delgado y grueso) de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de mango (HSM).



A= Intestino delgado, B= Intestino grueso, T0= 0% de harina de semilla de mango, T1=10% de harina de semilla de mango, T2=25% de harina de mango, T3=50% de harina de mango

## V. CONCLUSIONES

- Los pollos alimentados con una dieta que incluyo el 25% de harina de semilla de mango de, la población de *Escherichia coli* disminuyó significativamente en los días 7 (fase de inicio), 23 (crecimiento) y 42 (Fase de acabado).
- La población de *Lactobacillus* spp. aumentó significativamente en el grupo de pollos alimentados con una dieta que incluyo el 25% de harina de semilla de mango en los días 7(fase de inicio). 23 (crecimiento) y 42 (Fase de acabado), ejerciendo un efecto antagónico sobre *Escherichia coli*.

## VI. RECOMENDACIONES

- Incluir en los sistemas de producción avícola de forma generalizada en sus dietas de las aves la harina de semilla de mango al 25% para incrementar la población de *Lactobacillus* spp. y disminuir la de *Escherichia coli*, como medida de prevención de patógenos.
- Realizar más investigaciones mejorando la palatabilidad en porcentajes mayores de 50% de HSM y estudios sobre el mérito económico.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vaca L. Aspectos Administrativos y Económicos de la Empresa Avícola. In: Producción Avícola. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia; 2003. p. 221–37.
2. Yegani M, Korver D. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult Sci.* 2008;87:2052–2063.
3. Apajalahti J, Kettunen A. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves. In: Dieta y Microflora en aves [Internet]. XVIII Curso de Especialización FEDNA; 2002 [cited 2018 Apr 4]. p. 41–51. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/28179835>
4. Gibson GR, Willems A, Reading S, Collins MD. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. *Proc Nutr Soc.* 1996;55:899–912.
5. Reid CA, Hillman K. The effects of retrogradation on amylose/amylopectin ratio of starches on carbohydrate fermentation and microbial populations in the porcine colon. *Anim Sci.* 1999;68:503–10.
6. Spring P, Wenk C, Dawson KA. Biotechnology in the Feed Industry. In: Lyons T, Jacques K, editors. *Proceeding of Alltech's 11th Annual Symposium.* Nottingham University Press.; 2000. p. 383–8.
7. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;141(SUPPL.):S15–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
8. Diarra SS. Potential of mango (*Mangifera indica L.*) seed kernel as a feed ingredient for poultry: a review. *Worlds Poult Sci J* [Internet]. 2014;70(2):279–88. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0043933914000294](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0043933914000294)
9. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26(5):343–56.
10. Denny BJ, Lambert PA, West PWJ. The flavonoid galangin inhibits the L1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;208(1):21–4.
11. Sotelo D. I, Casas F. N, Camelo M. G. Borojó (*Borojoa patinoi*): Source of polyphenols with antimicrobial activity. *Vitae.* 2010;17(3):329–36.
12. Ravindran V, Sivakanesan R. The nutritive value of mango seed kernels for starting chicks. *J Sci food Agric.* 1996;71(2):245–50.
13. Moreno MJ. Evaluación fisicoquímica de una harina integral proveniente de semillas de mango (*Mangifera indica L.* Var. Bocado). *Ciencias Básicas Y Tecnológicas.* 1999;11(2):25–7.

14. Diarra S., Saleh B, Kwari ID, Igwebuikie J. Evaluation of boiled mango kernel meal as energy source by broiler chickens in the semi-arid zone of Nigeria. *Int J Sci Nat*. 2011;2(2):270–4.
15. Amao EA, Siyanbola MF. Carcass and physiological response of broilers fed dry heat treated mango (*Magnifera indica*) kernel based diet. *Glob J Poult Farming Vaccin* [Internet]. 2013;1:59–63. Available from: <http://academicjournals.org/journal/IJLP/article-abstract/05DCDD61794>
16. Pan D, Yu Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 2014;5(1):37–41.
17. Conway PL. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant WB, Hagemester H, editors. *Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. EAAP Publication no. 80, Dummerstof,; 1994. p. 231–240.
18. Korver DR. Overview of the immune dynamics of the digestive system. *J Appl Poult Res*. 2006;15:123.
19. Pedroso AA, Menten JFM, Lambaist MR. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *J Appl Poult Res*. 2005;14:232–237.
20. Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture dependent and culture independent analyses. *Syst Appl Microbiol*. 2001;24:610–7.
21. Walter J. Ecological role of *lactobacilli* in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:4985–96.
22. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*. 2011;149:88–105.
23. Mackie RI. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: Diversity and evolution. *Integr Comp Biol*. 2002;42:319–26.
24. Amit E, Sklan D, Uni Z. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poult Sci*. 2004;83:1093–1098.
25. Oviedo-rondón EO. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. *Edgar. Rev Bras Zootec*. 2009;38:209–25.
26. Allen HK, Stanton TB. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:297–315.
27. Forder REA, Howarth GS, Tivey DR, Hughes RJ. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poult Sci*. 2007;86:2396–2403.
28. Rakoff S, Paglino J, Eslami F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118:229–241.
29. Lunedo R, Fernandez MF, Carvalho FMS, Furlan LR, Macari M. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize- or sorghum-fed broiler chickens using realtime PCR. *Br Poult Sci*. 2014;55(6):795–803.

30. Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(1):124–37.
31. Lu J, Idris U, Harmon B, Maurer JJ, Lee MD, Hofacre C. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(11):6816–24.
32. Dibner JJ, Richards JD. *The Digestive System: Challenges and Opportunities.* Missouri USA: St. Charles; 2004.
33. Rogers BL, Bond JF, Craig SJ, Nault AK, Segal DB, Morgenstern JP. Potential therapeutic recombinant proteins comprised of peptides containing recombined T cell epitopes. *Mol Immunol.* 1994;31(13):955–66.
34. Collett SR. Strategies for improving gut health in commercial broiler operations. In: Lyons, Jacques., editors. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 21 st Annual symposium;* 2005. p. 17–29.
35. Fuller R, Perdigon G. *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health.* Iowa, USA.: Blackwell Publishing; 2003. p. 36.
36. Engberg RM, Hedemann MS, Steinfeldt S, Jensen BB. Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poult Sci.* 2004;83:925–38.
37. Stutz MW, Lawton GC. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. *Poult Sci.* 1984;63:2036–2042.
38. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci.* 2005;84:634–43.
39. Collier CT, Van der Klis JD, Deplancke B, Anderson DB, Gaskins HR. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3311 – 3317.
40. Niewold TA. The Nonantibiotic antiinflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci.* 2007;86:605–9.
41. Barnes H, Nolan L, Vaillancourt JP. Colibacillosis. In: Saif Y, editor. *Diseases of poultry.* 12 th edic. Iowa, USA.: Blackwell Publishing; 2008. p. 691–732.
42. Lee M, Nolan L. Colibacillosis. In: Dufour L., editor. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens.* 5th edició. Jacksonville (FL): American Association of Avian Pathologists; 2008. p. 10–1.
43. Baltzley T, Rehberg T. Characterization of avian pathogenic *E. coli* in a layer production facility. Wisconsin.; 2006.
44. Jansen T, Philipp HC, Voss M, Preisinger R, Wieler L. Multiplex PCR is the first technique to allow the specific and sensitive detection of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Lohmann Inf.* 2003;28:1–5.
45. Todar K. Pathogenic *E. coli* [Internet]. *textbookofbacteriology.net.* 2008 [cited 2019 Apr 12]. Available from: <http://www.textbookofbacteriology.net/>

46. Margall N, Domínguez A, Prats G, Salleras L. *Escherichia coli* Enterohemorrágico. Rev Española Salud Pública. 1997;71:437–443.
47. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the Prokaryotes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 th edici. New York: Springer - Verlag Berlin Heidelberg; 2004.
48. Naylor S, Gally D, Low J. Entehaemorrhagic *E. coli* in Veterinary Medicine. Int J Med Microbiol. 2005;295:419–41.
49. O'sullivan J, Bolton D, Duffy D, Baylis C, Tozzoli R, Wasteson Y. Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic *Escherichia coli*. Asthon Food Research Centre. Asthon Food Res Centre Dublín, Irlanda. 2007;34.
50. Wasteson Y. Zoonotic *Escherichia coli*. Acta Vet Scand Suppl. 2001;95:79–64.
51. Chaudury R, Henderson I. The Evolution of *Escherichia coli* Phylogeny. Infect Genet Evol. 2012;12:214–226.
52. Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. Microbes Infect. 2002;4:309–17.
53. Apajalahti J, Bedford MR. Improve bird performance by feeding its microflora. Worlds Poult Sci J. 1999;15:20–3.
54. Oviedo EO, Hume ME, Hernández C, Clemente S. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. Poult Sci. 2006;85:854–860.
55. Satokari RM, Vaughan EE, Smidt H, Saarela M, Matto J, De Vos WM. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and *lactobacilli* in the human gastrointestinal tract. Syst Appl Microbiol. 2003;26:572–584.
56. Tannock G, Fuller R, Pedersen K. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. Appl Env Microbiol. 1990;56(1310–1316.).
57. Roberts RF, Zottola EA. Shelf life of pasteurized process cheese spreads made for Cheddar cheese manufactured with a nisinproducing starter culture. J Dairy Sci. 1993;76:1829–36.
58. Roldán ML, Otero JL, Villarreal F, Baroni MR, Carrasco MS, Álvarez C. Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei*206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. Rev Soc Ven Microbiol. 2011;37:37–41.
59. Vinderola CG, Reinheimer, J A. Lactic acid starter and pro-biotic bacteria: A comparative“in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res Int. 2003;36:895–904.
60. Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría AI. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus spp.* sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 12];49(2):174–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>
61. Gómez S, Guzmán D. Efecto antagónico de BAL autóctonas del Huila sobre *Salmonella enteritidis* aviar. Pontificia universidad javeriana, Bogota; 1999.
62. Aguádelo D, Díaz M. Efecto antagónico de BAL aerobias y capnofílicas encontradas

- en leche y productos lácteos artesanales de 6 ciudades de Boyacá frente a *Salmonella enteritidis* aviar. Pontificia universidad javeriana, Bogota,; 1996.
63. Cástulo I, Del Campo M, Gómez H, Alaníz R. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. E-Gnosis Univ Guadalajara. 2008;6:1–17.
  64. Gutiérrez L, Gómez A, Arias L, Tangerife B. Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. Rev lasallista Investig. 2007;4(2):37–42.
  65. Cabeza E. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Universidad de Pamplona; 2005.
  66. Vasek O, Martínez M, Cardozo M. Antagonismo de bacterias lácticas de Corrientes y patógenos aislados de lechuga fresca. Efecto de *Lactobacillus plantarum* 59b y 93b VCOR. Vol. 6, Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad nacional del noreste.; 2008.
  67. Pedroso AA, Maurer J, Cheng Y, Lee MD. 2010 Informal Nutrition Symposium Remodeling the Intestinal Ecosystem Toward Better Performance and Intestinal Health. J Appl Poult Res. 2012;21(2):432–43.
  68. Apajalahti J, Kettunen A, Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. Worlds Poult Sci J [Internet]. 2004;60(2):223–32. Available from: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0043933904000200](http://journals.cambridge.org/abstract_S0043933904000200)
  69. Abad R, Capa M, Herrera V, Herrera R, Escudero G. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. Cent Biotencologia. 2017;6:98–108.
  70. Ghosh S, Gardner JM, Smoyer CJ, Friederichs JM, Unruh JR, Slaughter BD. Acetylation of the SUN protein Mps3 by Eco1 regulates its function in nuclear organization. Mol Biol Cell [Internet]. 2012;23(13):2546–59. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-07-0600>
  71. Van Der Wielen PWJJ, Keuzenkamp DA, Lipman LJA, Van Knapen F, Biesterveld S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. Microb Ecol. 2002;44(3):286–93.
  72. Apajalahti J. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. J Appl Poult Res. 2005;14(2):444–53.
  73. Wei S, Morrison M, Yu Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. Poult Sci. 2013;92(3):671–83.
  74. Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. Reproduction. 2002;123(3):419–27.
  75. Gast RK, Holt PS. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella enteritidis* different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. Poult Sci. 2000;79:559–63.

76. Cook N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J Microbiol Methods*. 2003;53:165–174.
77. Okamura M, Tachizaki H, Kubo T, Kikuchi S, Suzuki A, Takehara K. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars *Enteritidis*, *Typhimurium*, and *Gallinarum* biovar *Pullorum*, using 4 different challenge models. *Vaccine*. 2007;25(25):4837–44.
78. Methner U, Shabibi S, Meyer H. Infection Model for Hatching Chicks Infected with *Salmonella enteritidis*. *J Vet Med Ser B*. 1995;42(1–10):471–80.
79. Pedroso AA, Maurer J, Cheng Y, Lee MD. Informal Nutrition Symposium Remodeling the intestinal ecosystem toward better performance and intestinal health. *J Appl Poult Res*. 2012;21(2):432–43.
80. Cox NA. Effect of Fructooligosaccharide on *Salmonella* Colonization of the Chicken Intestine. 1992;(November 2015):2433–8.
81. Yin Y, Lei F, Zhu L, Li S, Wu Z, Zhang R. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME J*. 2010;4(3):367–76.
82. Wagner RD. No Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50:1061–1071.
83. Cressman MD, Yu Z, Nelson MC, Moeller SJ, Lilburn MS, Zerby HN. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(19):6572–82.
84. Nakphaichit M, Thanomwongwattana S, Phraephaisarn C, Sakamoto N, Keawsompong S, Nakayama J. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poult Sci*. 2011;90(12):2753–65.
85. Salanito JP, Blake IG, Muirehead PA, Maglio M, Goodman JR. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. *Appl Environ Microbiol*. 1978;35(4):782–90.
86. Gong J, Yu H, Liu T, Gill JJ, Chambers JR, Wheatcro R. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J Appl Microbiol*. 2008;104:1372–82.
87. Dumonceaux TJ, Hill JE, Hemmingsen SM, Kessel AG Van. Characterization of Intestinal Microbiota and Response to Dietary Virginiamycin Supplementation in the Broiler Chicken Characterization of Intestinal Microbiota and Response to Dietary Virginiamycin Supplementation in the Broiler Chicken †. *Society*. 2006;72(4):2815–23.
88. Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Denman SE, Moore RJ. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS One*. 2013;8(12):6–12.
89. Qu A, Brulc JM, Wilson MK, Law BF, Theoret JR, Joens LA. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS One*. 2008;3(8).
90. Sandhu KS, Lim ST. Structural characteristics and in vitro digestibility of mango

- kernel starches (*Mangifera indica* L.). Food Chem. 2007;107:92–7.
91. Fowomola MA. some nutrients and antinutrients contents of mango (*Magnifera indica*) seed. African J Food Sci. 2010;4(8):472–6.
  92. Odunsi AA. Response of laying hens and growing broilers to the dietary inclusion of mango (*Mangifera indica* L.) seed kernel meal. Trop Anim Health Prod. 2005;37(2):139–50.
  93. Dakare M, Ameh D, Agbaji A, Atawodi S. Effects of Processing Techniques on the Nutritional and Antinutritional Contents of Mango (*Mangifera indica*) Seed Kernel. World J Young Res. 2012;2(3):78–82.
  94. Kittiphoom S. Utilisation of mango seed. Int Food Res J. 2012;19(4):1325–35.
  95. Jadhav NV, Siddiqui MF. Handbook of poultry production and management. 2 th Edici. Jaypee B, editor. New Delhi - India: Medical Publishers; 2010. 383 p.
  96. Damron WS. Introduction to Animal Science. In: Global, Biological, Social, and Industry Perspectives,. 4th Edicio. New Jersey: Pearson Education Limited; 2009. p. 841.
  97. Saadany RMA, Roda YH, Saadany FM. Studies on starch extraction from mango seed (*Mangifera indica*) as a new source of starch. Starch/Starke. 1980;32:113–6.
  98. Ravindran V, Rajaguru ASB. Nutrient contents of some unconventional poultry feed. Indian. J Anim Sci. 1985;55:58–61.
  99. NRC. Nutrients Requeriments of poultry. In: National Research Council. Whashington D.C: National Academic Press; 1994. p. 27.
  100. Gunstone FD. Minor specialty oils. In: Shahidi F, editor. Nutraceutical and specialty lipids and their co-products. 2006. p. 91–126.
  101. El Boushy AR., Van Der Poel AFB. Handbook of poultry feed from waste: processing and use. New York: Springer - Verlag Berlin Heidelberg; 2000. 428 p.
  102. Patil SN, Netke SP, Dabadghao AK. Processing and feeding value of mango seed kernel for starting chicks. Br Poult Sci. 1982;23(3):185–190.
  103. Teguaia A. Substituting ground mango kernels (*Mangifera indica* L) for maize in broiler starter diets. Anim Feed Sci Technol. 1995;56(1–2):155–8.
  104. Joseph JK, Abolaji J. Effects of replacing maize with graded levels of cooked Nigerian mango-seed kernels (*Mangifera indica*) on the performance, carcass yield and meat quality of broiler chickens. Bioresour Technol. 1997;61:99–102.
  105. Arogba SS. Mango (*Mangifera indica*) kernel: chromatographic analysis of the tannin, and stability study of the associated polyphenol oxidative activity. J Food Compos Anal. 2000;12(2):149–156.
  106. Diarra SS, Usman BA. Growth performance and some blood variables of broiler chickens fed raw or boiled mango kernel meal. Int J Poult Sci. 2008;7(4):315–8.
  107. Kabuki T. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. Food Chem. 2000;71(1):61–6.
  108. Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. Mode of antibacterial

- action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 1998;48:125–129.
109. Cheynier V, Moutounet M, Sarni-Manchado P. Los compuestos fenólicos. In: Flanzky C, editor. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. España: Ed. MundiPrensa Libros; 2003. p. 797.
  110. Monagas M, Bartolomé B, Gómez C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45:85–118.
  111. Iwasaki Y, Matsui T, Arakawa Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. *J Gastroenterol*. 2004;39:831–7.
  112. Hertog M, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 1995;155(4):381–6.
  113. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673–751.
  114. O’Gara E, Hill DJ, Maslin DJ. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(5):2269–73.
  115. Kim T, Silva J, Jung Y. Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*. 2009;107:533–9.
  116. Paredes F, Clemente A. Polifenoles de aplicación en farmacia. *Offarm* [Internet]. 2005 [cited 2019 Apr 12];24(8):85–94. Available from: [www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13078579-S300](http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13078579-S300)
  117. Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 1987;26:2231–2240.
  118. Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biophys Res Commun*. 2003;306:530–536.
  119. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1147:132–136.
  120. Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anticandidal chalcones. *J Aust Dent*. 1997;42:343–346.
  121. Cervantes M. Coordenadas geográficas de Tucume, Perú [Internet]. *Dateandtime.info*. *Dateandtime.info*; 2017 [cited 2017 Nov 20]. Available from: <http://dateandtime.info/es/citycoordinates.php?id=3691161>
  122. Climate-Data.org. Clima Tucume [Internet]. 2019 [cited 2017 Nov 20]. Available from: <https://es.climate-data.org/location/49804/>
  123. Googlemaps. Mapa satelital del distrito de Tucume [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 12]. Available from: <https://www.google.com.pe/maps/place/Tucume+Viejo,+Tucume+14120/@6.51270>

94,79.8444971,2969m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x904c90c463047493:0x8943f2f644b5eee8!8m2!3d-6.5055035!4d-79.8456987

124. Martínez Y, Valdivié M, Martínez O, Estarrón M, Córdova J. Utilización de la semilla de calabaza ( *Cucurbita moschata* ) en dietas para pollos de ceba. Rev Cuba Cienc Agrícola [Internet]. 2010;44(4):393–8. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017783011>
125. Chiroque G, Vásquez G, Vásquez E, Vásquez E, Más D, Betancur C. Growth Performance, Carcass Traits and Breast Meat Fatty Acids Profile of Helmeted Guinea Fowls (*Numida meleagris*) Fed Increasing Level of Linseed (*Linum usitatissimum*) and Pumpkin Seed (*Cucurbita moschata*) Meals. Brazilian J Poult Sci [Internet]. 2018 Dec [cited 2018 Dec 24];20(4):665–74. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516635X2018000400665&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516635X2018000400665&lng=en&tlng=en).
126. Perusquía MT, Paasch L. Necropsia en aves. Mexico D.F.: Editorial Trillas. S.A.; 1985.
127. Guerra A, Agurto T. Microbiología Básica. Universidad Ricardo Palma; 2004.
128. Salanitro JP, Fairchilds IG, Zgornicki YD. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. Appl Microbiol. 1974;27(4):678–687.
129. Huda-Faujan N, Abdulmir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. J Open Biochem. 2010;13(4):53–58.
130. Ruiz A, Williams SK, Dyeri N, Hinton AJ, Rodrick GE. Nisin affects the growth of *listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey ham stored four degrees celsius for sixty-three days. Poult Sci. 2010;89(2):353–358.

## VIII. ANEXOS

Anexo 01. Análisis bromatológico de harina de semilla de mango.

Indicadores (g/100g)	X±S
Humedad	8.66±0.12
Ceniza	2.14±0.04
Grasa	11.66±0.06
Proteína Bruta	5.63±0.19
Fibra	2.39±0.08
Carbohidratos totales	72.02±0.17
Energía (Kcal)	3331.43 ± 0.24

Anexo 2. Composición, aporte y costo de la dieta en la fase de inicio de pollos Cobb 500.

Ingredientes	Niveles de harina de semilla de mango (%)			
	0	10	25	50
Harina de semilla de Mango	0.00	10.00	25.00	50
Harina de Maíz	58.13	47.68	31.25	3.00
Harina de soya	37.00	37.90	39.15	41.50
Aceite de soya	1.00	0.90	1.40	2.40
Fosfato di cálcico	1.00	1.70	1.46	1.76
Carbonato de Calcio	1.55	1.00	0.9	0.5
Sal	0.10	0.10	0.1	0.1
Metionina 99%	0.21	0.22	0.24	0.24
Lisina 99%	0.01	0.001	0.001	0.001
Poultry Grow 250	1.00	0.50	0.7	0.5
Costo (S/. Kg)	1.73	1.52	1.36	1.11

Aporte (%)				
EM (Kcal/g)	3067.15	3047.02	3046.53	3035.44
Proteína Bruta (%)	23.00	23.05	23.01	23.01
Calcio (%)	0.99	0.98	0.90	0.86
Fosforo disponible (%)	0.39	0.47	0.40	0.40
Fibra Bruta (%)	2.46	2.50	2.54	2.59
Lisina	1.25	1.25	1.25	1.25
Metionina	0.59	0.58	0.58	0.54
Extracto Etéreo	3.91	3.90	3.95	4.30

Anexo3. Composición, aporte y costo de la dieta en la fase de crecimiento de pollos Cobb 500.

Ingredientes	Niveles de harina de semilla de mango (%)			
	0	10	25	50
Harina de semilla de Mango	0.00	10.00	25.00	50.00
Harina de Maíz	67.00	55.75	39.70	10.90
Harina de soya	29.05	30.00	31.20	33.85
Aceite de soya	0.00	0.40	0.80	2.00
Fosfato di cálcico	0.67	0.67	0.60	0.72
Carbonato de Calcio	1.60	1.5	1.5	1.4
Sal	0.15	0.15	0.15	0.15
Metionina 99%	0.15	0.15	0.15	0.20
Lisina 99%	0.08	0.08	0.08	0.080
Poultry Grow 250	1.3	1.3	0.82	0.7
Costo (S/. Kg)	1.79	1.59	1.36	1.23
Aporte (%)				
EM (Kcal/g)	3087.46	3084.99	3086.21	3084.03
Proteína Bruta (%)	20.05	20.02	20.00	20.08
Calcio (%)	0.90	0.87	0.87	0.91
Fosforo disponible (%)	0.35	0.32	0.28	0.25
Fibra Bruta (%)	2.40	2.43	2.47	2.52
Lisina	1.09	1.07	1.07	1.08
Metionina	0.49	0.47	0.45	0.46
Extracto Etéreo	3.10	3.58	3.88	4.04

Anexo 4. Composición, aporte y costo de la dieta en la fase de acabado de pollos Cobb 500.

Ingredientes	Niveles de harina de semilla de mango (%)			
	0	10	25	50
Harina de semilla de Mango	0.00	10.00	25.00	50.00
Harina de Maíz	72.70	60.00	45.15	17.20
Harina de soya	23.95	25.40	26.10	28.65
Aceite de soya	1.12	0.00	0.00	1.00
Fosfato di cálcico	0.40	0.95	0.60	0.70
Carbonato de Calcio	1.45	1.47	1.25	1.10
Sal	0.15	0.20	0.20	0.15
Metionina 99%	0.05	0.20	0.20	0.15
Lisina 99%	0.02	0.08	0.10	0.050
Poultry Grow 250	0.86	1.7	1.4	1.00
Costo (S/. Kg)	1.64	1.64	1.40	1.08
<b>Aporte (%)</b>				
EM (Kcal/g)	3077.82	3085.58	3080.98	3083.15
Proteína Bruta (%)	18.00	18.20	18.05	18.14
Calcio (%)	0.75	0.92	0.76	0.77
Fosforo disponible (%)	0.31	0.36	0.29	0.25
Fibra Bruta (%)	2.35	2.37	2.43	2.49
Lisina	0.90	0.94	0.94	0.92
Metionina	0.36	0.50	0.47	0.39
Extracto Etéreo	4.31	4.45	4.52	5.21

Anexo 5. Agares utilizados para el sembrado

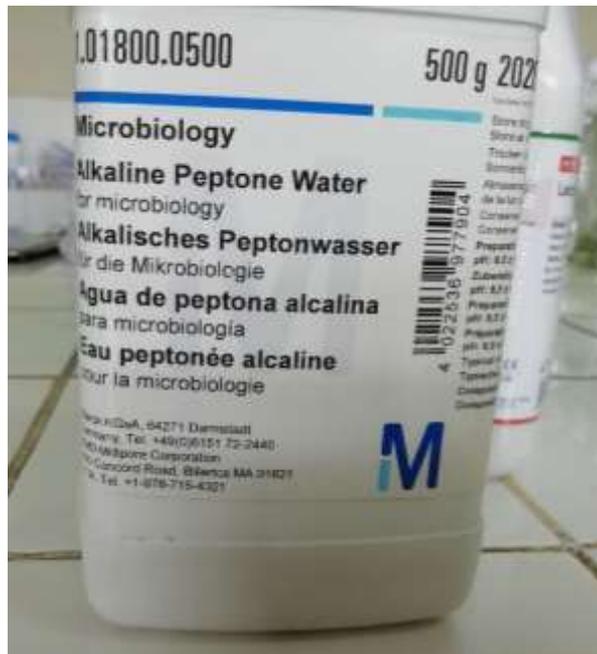


Agar MRS para *Lactobacillus spp*

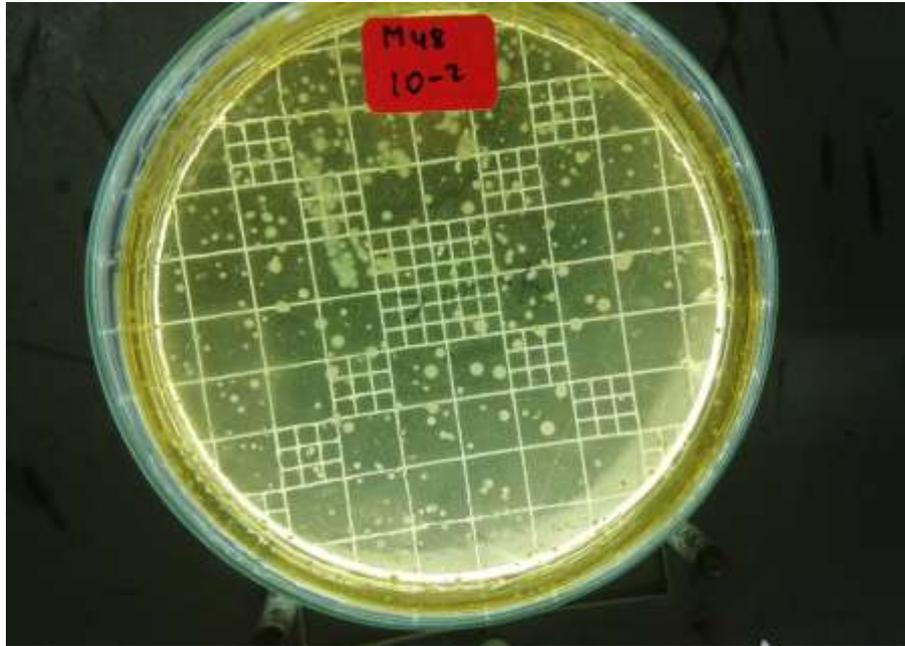


Agar TBX para *Escherichia coli*

Anexo 6. Agua de peptona alcalina para las diluciones

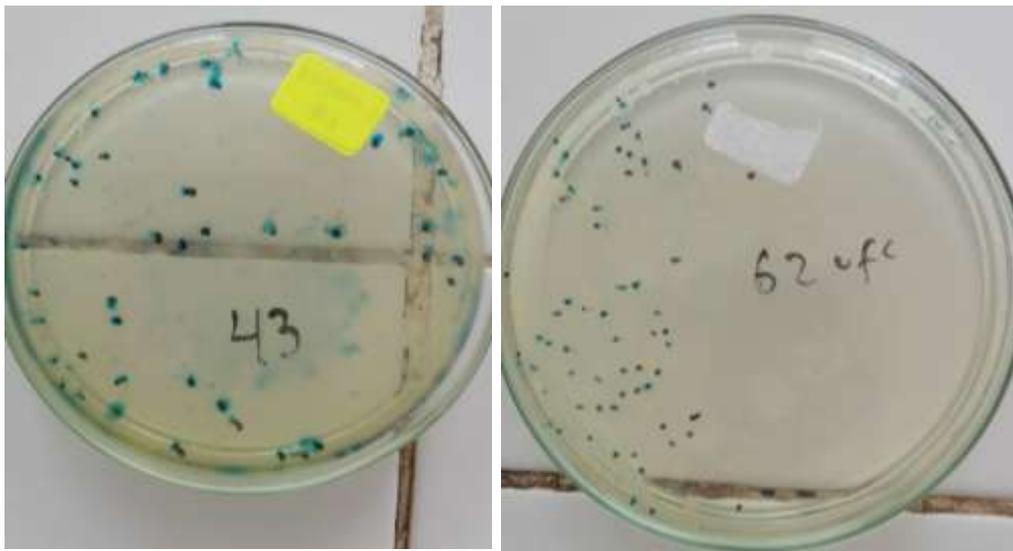


Anexo 7. *Lactobacillus spp*



Colonias de *Lactobacillus spp* en el contador de colonias

Anexo 8. *Escherichia coli*

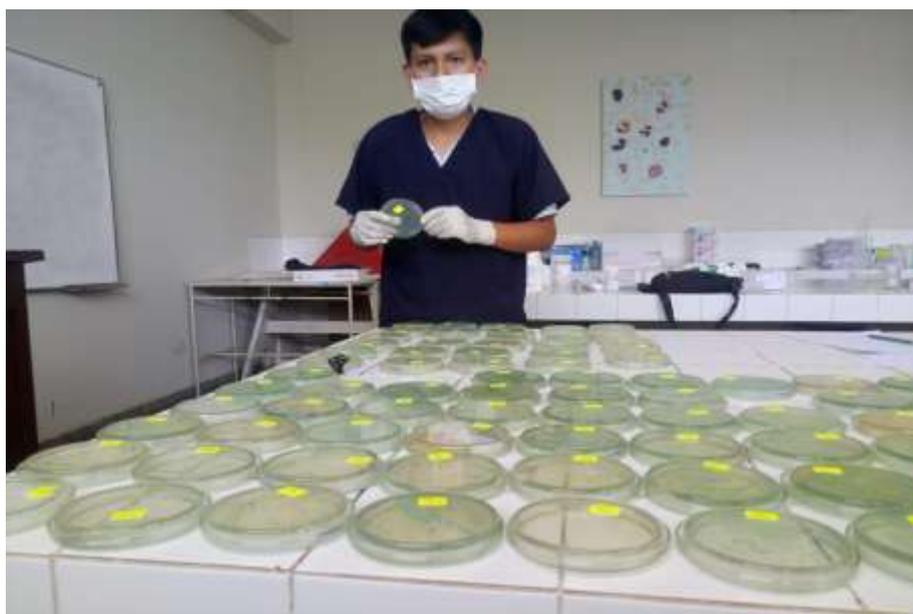


Colonias de *Escherichia coli*, color azul violeta

Anexo 9. Conteo de colonias de *Lactobacillus spp*



Anexo 10. Conteo de colonias de *Escherichia coli*



Anexo 11. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli*



Anexo 12. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Lactobacillus spp*



Se observa turbidez en el medio