

UNIVERSIDAD NACIONAL

“PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

MÉDICA VETERINARIA

**EFECTO DE HARINA DE ZAPALLO (*Cucurbita maxima Duchesne*) Y
ORÉGANO (*Origanum vulgare*) EN LA MICROBIOTA INTESTINAL
EN POLLOS COBB 500.**

Investigador : Bach. M.V. Correa Gasco Rocío Mardony

Bach. M.V. De La Cruz Camacho Sisi Pascuala

Asesor : M.Sc. M.V. Vicente Gonzales Julca.

Coasesor : M.Sc. M.V. Edgar Vásquez Sánchez

LAMBAYEQUE - PERÚ, 2019

**“EFECTO DE HARINA DE ZAPALLO (*Cucurbita maxima Duchesne*) Y ORÉGANO
(*Origanum vulgare*) EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN POLLOS COBB 500”**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICA VETERINARIA**

PRESENTADO POR

Correa Gasco Rocío Mardony

De La Cruz Camacho Sisi Pascuala

PRESENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

**MV. MSc CÉSAR PISCOYA VARGAS
PRESIDENTE**

**MV. CÉSAR MORANTE CHAVARRY
SECRETARIO**

**MV. ADRIANO CASTAÑEDA LARREA
VOCAL**

**MV. MSc. VICENTE GONZALES JULCA
PATROCINADOR**

**MV. MSc. EDGAR VÁSQUEZ SÁNCHEZ
CO-PATROCINADOR**

DEDICATORIA

ROCÍO MARDONY CORREA GASCO

A Dios, por haberme dado la vida y por estar siempre conmigo guiándome en cada paso que doy, ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez.

*A mis padres Rocío Gasco Barsallo y Gilmer Correa Carhuatanta por su amor, trabajo y sacrificio, por haberme forjado como la persona que soy, siempre apoyándome incondicionalmente en mi vida académica y motivándome constantemente para alcanzar mis anhelos. Todos mis logros se los debo a ustedes.
Los quiero mucho.*

A mi hermano Gilmer Correa Gasco, por ser mi ejemplo a seguir.

SISI PASCUALA DE LA CRUZ CAMACHO

A Dios por guiarme en el camino correcto, porque nunca me ha abandonado, gracias por haberme dado una excelente familia, por permitirme conocer excelentes profesores y amigos, por darme salud, sabiduría y porque has llenado mi corazón con la luz de tu espíritu dejando que cumpla esta meta.

A mi abuelo Víctor Camacho Reyes, que, aunque ya no se encuentra con nosotros físicamente siempre estará presente en mi corazón, por enseñarme desde niña a ser fuerte e inculcarme valores.

A mi abuela Isidora Vásquez Fernández, por su apoyo incondicional, por sus consejos y por saber guiarme en todo momento.

A mi madre Rosa Victoria Camacho Vásquez, por todo el apoyo que me ha dado a lo largo de mi carrera, por ser mi motor y ayudarme a cumplir cada meta propuesta, por su amor incondicional. Todos mis triunfos son para ti y por ti.

A mi padre Julio De La Cruz Paico, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera.

A mi hermana y mejor amiga Yuliana De La Cruz Camacho, por el gran apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, por no soltar mi mano nunca y por ser mi ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por todas sus bendiciones, a nuestros Padres que han sabido darnos su ejemplo de trabajo y honradez.

A mi compañera y gran amiga Sisi, porque somos un gran equipo, por su empeño y empuje, gracias a ello logramos esta meta juntas.

A mi compañera y gran amiga Rocío, porque somos un gran equipo, por su empeño y empuje, gracias a ello logramos esta meta juntas.

INDICE

Contenido	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1.ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	3
2.2.MARCO TEORICO	6
2.2.1. Microbiota del tracto gastrointestinal en aves.....	6
2.2.2. Bacterias patógenas en el TGI en aves	9
2.2.3. Bacterias benéficas en el TGI en aves.....	11
2.2.4. Composición de la microbiota intestinal del ave.	14
2.2.5. Microbiota del TGI en aves durante su vida productiva.....	16
2.2.6. Microbiota en aves según órganos del TGI.....	18
2.2.7. Zapallo.....	20
2.2.8. Orégano.....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1.MATERIALES	28
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	29
3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO:	29
3.2.DISEÑO METODOLOGICO	29
3.2.1. UBICACIÓN GEOGRAFICA	29
3.2.2. Galpón experimental.....	30
3.2.3. Semilla de zapallo y orégano	30
3.2.4. Análisis bromatológico de harina de semilla de zapallo y harina de orégano	31
3.2.5. Alimentación	31
3.2.6. Necropsia.....	31
3.2.7. Análisis de la muestras.....	32
3.2.8. Prueba de identificación de microorganismos.....	34
3.3.METODO ESTADISTICO	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. <i>Escherichia coli</i>	39
4.2. <i>Lactobacillus spp</i>	44
V. CONCLUSIONES	50
VI. RECOMENDACIONES	51
VII. BIBLIOGRAFIA	52
VIII. ANEXOS	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del fruto de zapallo en 100 g.....	21
Tabla 2. Composición química de semilla de <i>Cucurbita maxima</i>	22
Tabla 3. <i>Escherichia coli</i> (10^4 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 7.....	38
Tabla 4. <i>Escherichia coli</i> (10^4 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 22.....	40
Tabla 5. <i>Escherichia coli</i> (10^4 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 42.....	41
Tabla 6. <i>Lactobacillus spp</i> (10^5 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 7.....	43
Tabla 7. <i>Lactobacillus spp</i> (10^5 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 22.....	44
Tabla 8. <i>Lactobacillus spp</i> (10^5 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 42.....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del ecosistema intestinal.....	6
Figura 2. Composición de la microbiota en el íleon y ciego en pollos.....	19
Figura 3. Estructura química de componentes principales de <i>Origanum vulgare</i>	25
Figura 4. Mapa satelital del lugar de estudio: Túcume – Lambayeque.....	29
Figura 5. <i>Escherichia coli</i> (10^4 UFC) en pollos Cobb 500, alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO).....	42
Figura 6. <i>Lactobacillus</i> spp (10^5 UFC) en pollos Cobb 500, alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)	46
Figura 7. <i>Lactobacillus</i> spp (10^5 UFC) y <i>Escherichia coli</i> (10^4 UFC) en el intestino delgado de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)	47
Figura 8. <i>Lactobacillus</i> spp (10^5 UFC) y <i>Escherichia coli</i> (10^4 UFC) en el intestino grueso de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO).....	47

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de harina de zapallo (*Cucurbita maxima duchesne*) y orégano (*Origanum vulgare*) en la microbiota intestinal en pollos Cobb 500; realizado en un galpón experimental ubicado en el distrito de Túcume Lambayeque – Perú, en los meses de Diciembre del 2018 hasta febrero del 2019. Las semillas de zapallo y orégano estuvieron almacenados y secados sin tratamiento alguno, para luego ser sometidos a molienda. Los pollos fueron de la línea Cobb 500 alimentados con harina de semillas de zapallo (HSZ) y orégano (HO), distribuidos en cuatro tratamientos: T0= 0% de HSZ - HO, T1=10% HSZ - 0.5% HO, T2=10% HSZ - 1% HO y T3=10% HSZ. Se sacrificaron en la fase de inicio (día 7) crecimiento (22 días) y acabado (42 días) en el laboratorio de Fisiología Veterinaria de la UNPRG, separándose los segmentos del intestino delgado (Duodeno, yeyuno, íleon) y grueso (Ciegos y colon) luego se procedió al aislamiento con agar peptona, para el crecimiento de colonias se empleó el Agar TBX: *Escherichia coli* y Agar MRS Lactobacillus: *Lactobacillus* spp., la identificación se realizaron pruebas bioquímicas (TSI, LIA, Citrato de Simons, Caldo glucosado, prueba del Indol) y se realizó el conteo de colonias en las placas Petri. Se encontró que la población de *Escherichia coli* disminuyó ($p<0.01$) en el grupo de pollos alimentados el 10% HSZ y el 0.5% HO en los días 7, 22 y 42; de igual manera en el mismo grupo se observó que la población de *Lactobacillus* spp aumentó ($p<0.01$); en donde la población de *Lactobacillus* spp, tuvo un efecto antagónico con respecto a la población microbiana de *Escherichia coli*.; comprobándose el efecto antimicrobiano al emplear la inclusión en la dieta del 10% HSZ y 0.5 % HO.

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

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effect of pumpkin meal (*Cucurbita maxima duchesne*) and oregano (*Origanum vulgare*) on the intestinal microbiota in Cobb 500 chickens; Made in an experimental shed located in the district of Túcume Lambayeque, Peru, in the months of December 2018 to February 2019. Pumpkin seeds and oregano were stored and dried without any treatment, and then subjected to grinding. The chickens were from the Cobb 500 line fed with pumpkin seeds (HSZ) and oregano (HO), distributed in four treatments: T0 = 0% of HSZ - HO, T1 = 10% HSZ - 0.5% HO, T2 = 10% HSZ - 1% HO and T3 = 10% HSZ. They were sacrificed in the initial phase (day 7), growth (22 days) and completion (42 days) in the veterinary physiology laboratory of the UNPRG, separating the segments of the small intestine (duodenum, jejunum, ileum) and thickness (blind) and colon) then proceeded to the isolation with peptone agar, for the growth of colonies the TBX Agar was used: *Escherichia coli* and LRS *Lactobacillus* Agar: *Lactobacillus* spp., identification was carried out biochemical tests (TSI, LIA, Citrate de Simons, Glucose broth, Indol test) and the colony count was performed on the Petri dishes. It was found that the population of *Escherichia coli* decreased significantly ($p < 0.01$) in the group of chickens fed 10% HSZ and 0.5% HO on days 7, 22 and 42; Similarly, the same group observed an increase in the population of *Lactobacillus* spp. increased ($p < 0.01$); noting that by increasing the population of *Lactobacillus* spp. had an antagonistic effect with respect to the microbial population of *Escherichia coli*; The antimicrobial effect was verified using the inclusion in the diet of 10% HSZ and 0.5% HO.

Key words: Pumpkin seed flour, Oregano flour, Cobb 500 chickens, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp.

I. INTRODUCCIÓN

La clave de la productividad de todos los animales de granja radica en el desarrollo y salud del tracto gastrointestinal (TGI)⁽¹⁾, entendiéndose que el intestino, órgano complejo que forma parte del TGI y es el paso obligado de los nutrientes que sirven de base para el metabolismo, crecimiento y mantenimiento; además, aportan los recursos para el sistema inmunológico, sistema esquelético y nervioso ⁽²⁾.

El lumen intestinal sano es colonizado por una gran población de bacterias y a su vez es un sitio importante para la entrada de microorganismos patógenos; el establecimiento de esta población en el tracto gastrointestinal (TGI) ocurre inmediatamente después del nacimiento, cuando empiezan a consumir alimento ⁽³⁾.

El uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC) han permitido mejorar los niveles de producción pero se les atribuye la aparición de cepas multiresistentes a los antimicrobiales, sin embargo, cada vez más países prohíben la utilización de APC, debido a que estos pueden conducir al desarrollo de resistencia bacteriana⁽⁴⁾.

Al decir de Oosterhaven *et al.* y Lambert *et al.*,^(5,6) en la búsqueda de encontrar insumos orgánicos que reemplacen y promuevan el equilibrio homeostático de la microbiota intestinal en pollos de engorde, el orégano, considerado como el primer antiséptico natural y de amplio poder microbicida bloquea el crecimiento virtualmente de cualquier hongo, así como también inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias; el carvacrol y el timol son los responsables de su poder antibacteriano encontrándose sus sitios de acción dentro de las células y dependiendo de las concentraciones utilizadas, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos. Los puntos de ataque de estos agentes antimicrobianos dentro de las células influyen en la pared y membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistema genético⁽⁷⁾.

Por otra parte las semillas *Cucurbita maxima* tienen actividad farmacológica tales como: antidiabético, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatorio y efectos antioxidantes⁽⁸⁾; debido a sus compuestos fenólicos llamados cucurbitacinas las cuales tienen roles importantes en la medicina tradicional como propiedades, anti-inflamatorias, antifebril, antihelmíntica y antimicrobianas⁽⁹⁾. Además estas semillas muestran niveles lipídicos por encima del 30% de los cuales contiene los ácidos grasos omega 3, 6 y 9, importantes reductores de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos siendo suministrados en las dietas de animales monogástricos^(10,11).

Los omegas 3 y 6, son ácidos grasos esenciales debido a que estructuralmente forman parte de las membranas celulares asegurando su estabilidad, son los responsables de mantenerlas fluidas y flexibles. Ambas familias de ácidos grasos son necesarias para el correcto funcionamiento del organismo, y es por ello que es importante que las incorporemos en la dieta en las proporciones adecuadas, además están implicados en la modulación de las respuestas inflamatorias de las células⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

Escherichia coli es una de las especies predominantes de la microbiota intestinal en las aves, representando el 60%, siendo una de las bacterias más importantes en la avicultura, causante de la colibacilosis aviar y generando cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial.

Es por ello que evaluaremos el efecto de harina de zapallo (*Cucurbita maxima Duchesne*) y orégano (*Origanum vulgare*) en la microbiota intestinal en pollos Cobb 500, en donde identificaremos las especies *Lactobacillus* ssp., *Escherichia coli*, en el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (colon y ciegos) en pollos Cobb 500 alimentados con harina de zapallo (*Cucurbita maxima Duchesne*) y orégano (*Origanum vulgare*) y cuantificaremos la población de *Lactobacillus* ssp., *Escherichia coli*, en el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (colon y ciegos) en pollos Cobb 500 alimentados con harina de zapallo (*Cucurbita maxima Duchesne*) y orégano (*Origanum vulgare*).

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

López, E. A.⁽¹⁴⁾ evaluó in vitro el efecto antimicrobiano del aceite de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en concentraciones al 30%, 60% y 90% en dilución de aceite de orégano. Se determinó la concentración mínima inhibitoria, para la cepa *Escherichia coli*, donde presentó turbidez al 30% en todas sus horas establecidas, mientras que al 60 % y 90% no presentó turbidez, por otro lado, para la cepa *Staphylococcus aureus*, no se presentó turbidez en ninguna de sus concentraciones; por otra parte se determinó la concentración mínima bactericida sobre la cepa *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde la cepa *Escherichia coli* al 30% presentó formación de colonias en todos sus tiempos establecidos, mientras que al 60% y 90% no existió crecimiento bacteriano; por otro lado para la cepa *Staphylococcus aureus*, no existió crecimiento bacteriano en ninguna de las tres concentraciones. En cuanto a los halos de sensibilidad en la cepa *Escherichia coli* se obtuvo como valor mínimo un diámetro de 13.01mm al 30% y un valor máximo de 17.62mm al 60% respectivamente, determinando que el aceite de orégano impide el crecimiento de bacterias desde su valor mínimo al 30%. Por otro lado en el análisis de varianza los resultados obtenidos en los tratamientos al 60% y 90%, no son significativamente diferentes ($p = <0.05$) mostrándose estadísticamente iguales con valores de 17.62 mm y 16.05 mm respectivamente, en relación al 30% con un valor de 13.01 mm en halos de inhibición para la cepa *Escherichia coli*, mientras que las diluciones de los tratamientos al 30%,60% y 90% frente a la cepa *Staphylococcus aureus* son estadísticamente diferentes ($p = <0.05$) con valores de 13.25 mm, 16.35 mm y 25.00mm de halos de inhibición.

Roofchae, *et al.*⁽¹⁵⁾ Realizó una prueba de alimentación para investigar los efectos del aceite esencial del orégano (AEO) (*Origanum vulgare* L.) en el rendimiento de pollos de engorde, microbiota cecal y actividad antioxidante sérica. Se utilizaron pollos de engorde de 1 día de edad que fueron divididos al azar en cuatro grupos. El grupo 1 se mantuvo como control normal y recibió dieta basal. Las aves de los grupos 2, 3 y 4 se trataron con dieta basal suplementada con 300, 600 y 1200 mg / kg de AEO. Como resultados en cuanto a la microbiota cecal, se obtuvo que las poblaciones de *Lactobacillus* (bacterias del ácido láctico) no se vieron afectadas y las poblaciones de *Escherichia coli* cecal fueron significativamente menores en 300 mg / kg (5.10 log cfu/g) y 600 mg / kg (5.11 log cfu/g) de grupos suplementados con AEO en comparación con el control (5.73 log cfu/g) y 1200 mg / kg de AEO (5.60 log cfu/g).

Kırkpınar *et al.*,⁽¹⁶⁾ Determinaron los efectos individuales y combinados de los aceites esenciales de orégano y ajo sobre el rendimiento, las características de la canal, el órgano y la sangre y la microflora intestinal de los pollos de engorde. Las dietas se complementaron con: sin aceite esencial (control), aceite esencial de orégano a 300 mg / kg, aceite esencial de ajo a 300 mg / kg y aceite esencial de orégano a 150 mg / kg + aceite esencial de ajo a 150 mg / kg. Se encontró en la microbiota del íleon una disminución significativa de *Clostridium* spp (5.57 log cfu×g¹) en pollos alimentados con aceite de orégano y ajo con respecto al control (6.46 log cfu×g¹); mientras la colonia de *Lactobacillus* spp no varío con respecto al control (6.42 cfu×g¹) (p>0.05).

Jang, I.S. *et al.*⁽¹⁷⁾ Evaluaron la mezcla de aceites esenciales (OE) extraída de hierbas para el rendimiento del crecimiento, las enzimas digestivas y la actividad antimicrobiana del intestino en pollos de engorde en crecimiento. Un total de ciento veinte pollos de engorde de 3 días de edad fueron asignados a la dieta basal (Control) y a la dieta basal suplementada con 10 mg de antibióticos / kg de dieta (ANTI), 25 mg de EO / kg de dieta (EO I) y 50 mg EO / kg Dieta (EO II) hasta los 35 días de edad. No hubo diferencias en el peso corporal, la ingesta de alimento, la ganancia total y la proporción de ganancia de alimento entre las aves alimentadas con la dieta basal y la dieta suplementada con antibióticos, EO I y EO II. El peso de los órganos digestivos, incluidos el hígado, el páncreas, el intestino y los tejidos mucosos, no se vio afectado por los tratamientos dietéticos. Las actividades totales y específicas de la tripsina pancreática aumentaron significativamente (P <0.05) en las aves alimentadas con dieta EO II en comparación con las alimentadas con dietas CONTROL y ANTI. También se

observó que las actividades totales de α -amilasa pancreática y maltasa intestinal aumentaron significativamente ($P < 0.05$) en aves alimentadas con dieta EO II en comparación con aquellas alimentadas con dieta CONTROL. Las unidades formadoras de colonias (UFC, log/g) de *Escherichia coli* en la digesta de ileon y ciego, el grupo ANTI (2.3 ± 0.52 UFC, log/g) mostró un número significativamente menor en comparación con el grupo CONTROL (3.8 ± 0.29 UFC, log/g). Sin embargo, no hubo diferencias en la CFU de *E. coli* entre los grupos ANTI y EO, pero si se observó una disminución entre EO I (2.7 ± 0.44 UFC, log/g), EO II (2.8 ± 0.58 UFC, log/g) con respecto al CONTROL (3.8 ± 0.29 UFC, log/g). La UFC de lactobacilos no se vio afectada por la suplementación dietética de OEI (4.0 ± 0.93 UFC, log/g), EO II (5.5 ± 0.22 UFC, log/g) con respecto al grupo de antibióticos (4.7 ± 1.04 UFC, log/g).

Del Castillo *et al.*(18) Evaluaron la actividad antibacteriana del extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Se utilizó extracto hexánico, lo cual generó inhibición significativa desde la dilución 0,16 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa de *S. aureus* ATCC 43300. Para la cepa clínica de *E. coli*, a partir de 0,16 $\mu\text{g/mL}$ inhibieron significativamente su crecimiento a partir de 0.16 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para *K. pneumoniae* no hubo inhibición significativa en ninguna de las concentraciones evaluadas.

Ravishankar, K.⁽⁸⁾ evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de semilla de *Curcubita maxima*, perteneciente a las *curcubitaceas* frente a organismos Gram negativos (*Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), en donde demostraron que tuvo una buena actividad antimicrobiana; en *Escherichia coli*, zona de inhibición 100 mg/ml (12 ± 2.29), 200 mg/ml (16 ± 1.68), frente a la aplicación de Amikacina (25 $\mu\text{g/ml}$) que tuvo una zona de inhibición de 14 ± 1.36 .

El Zawane Kamarudin, Q. *et al.*(19) Exploraron el potencial antibacteriano in vitro de la cáscara de *Cucurbita moschata* Duchesne “calabaza tropical” contra bacterias patógenas humanas, enfrentaron extractos de diclorometano (DCM), metanol (MEOH) y acuosos de la cáscara contra ocho cepas bacterianas: *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* aplicando la susceptibilidad de difusión del disco Kirby-Bauer y los métodos de microdilución en caldo. Concluyendo que la cáscara de *C. moschata* posee compuestos antibacterianos y

podría ser potencial fuente de una nueva clase de antibióticos, en el caso de *E. coli* se redujo el diámetro de inhibición a 12 ± 2.8 en comparación con el grupo que usaron tetraciclina y cloranfenicol que tuvieron. 15.0 ± 0.7 y 17.0 ± 0.7 respectivamente.

2.2. MARCO TEORICO.

2.2.1. Microbiota del tracto gastrointestinal en aves

En el tracto gastrointestinal de las aves habita una comunidad diversa de bacterias, hongos, protozoos y virus, que interactúan constantemente con el huésped. La adquisición y desarrollo de esta microbiota intestinal en las aves se origina desde la eclosión del pollito, junto con los microbios que se encuentran en la superficie de la cáscara del huevo, los cuales corresponden a microorganismos del intestino de la madre, además de fuentes externas presentes en el medio ambiente, el alimento y el personal que manipula los animales. Esto influye sobre la población intestinal de los pollos⁽²⁰⁾.

La microbiota intestinal es un componente esencial del ecosistema intestinal y se lo reconoce como un órgano olvidado, que contribuye al bienestar del huésped animal en una variedad de aspectos, especialmente la nutrición y la resistencia a enfermedades⁽²¹⁾.

Las exigencias de las políticas Europeas han permitido el desarrollo de investigaciones encaminadas a buscar alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento (APC). Las investigaciones se han visto involucradas con una visión más integral buscando la “salud intestinal”. La cual depende del equilibrio de tres factores principales: dieta, mucosa (huésped) y microbiota⁽²²⁾, como se representa en la figura 1.

Figura 1. Representación esquemática del ecosistema intestinal



Fuente: Modificado de Conway(22)

El tracto gastrointestinal (TGI) de las aves es un refugio cálido para una microbiota compleja que consiste principalmente en bacterias anaeróbicas. A medida que el huésped crece, esta microbiota se vuelve muy diversa hasta que alcanza un estado relativamente estable pero dinámico⁽²¹⁾

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⁽²³⁾. El componente más importante del TGI es la población de microorganismos, la cual representa entre el 1 y 2% del peso corporal⁽²⁴⁾. Como ocurre en el caso de la anatomía del TGI, las aves han tenido que adaptar su microbiota en función de sus necesidades⁽²⁵⁾. En el TGI de los animales y el hombre, además de bacterias, que son las mayoritarias, conviven levaduras, protozoos, hongos y bacteriófagos⁽²⁶⁾. El ecosistema microbiano de animales y hombres está formado por más de 10^{14} UFC en total^(28,30). 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 del bolo alimenticio en El TGI, la utilización de nutrientes, la maduración intestinal o la modulación del sistema inmune^(30,31). Sin embargo, su función más importante consiste en crear una barrera

defensiva frente a patógenos^(32,34). De acuerdo con Lunedo *et al.*⁽³⁵⁾ existen dos lugares importantes donde habitan las bacterias intestinales con funciones diferenciadas: la mucosa y los contenidos del lumen. Las bacterias asociadas a la mucosa tienen una clara influencia sobre la estructura funcionalidad de la mucosa; las que habitan el contenido intervienen en la digestión de nutrientes e hidrólisis de compuestos y proporcionan nutrientes para la comunidad bacteriana propia y para el animal que la hospeda.

Debido a la alta intensidad del peristaltismo en el intestino delgado, la colonización en el lumen de las bacterias en esta zona es menos rápida y favorable. Se demora aproximadamente dos semanas en alcanzar estabilidad microbiana, y se constituye en su mayoría por bacterias anaerobias facultativas como *Lactobacillus* spp, *Enterococcus* spp y *Escherichia coli*, las cuales representan entre el 60% y el 90% de la microbiota intestinal. Otras especies que se encuentran comúnmente en el duodeno son los anaerobios obligados como *Eubacterias*, *Clostridios*, *Propionibacterias* y *Fusobacterias*⁽³⁶⁾.

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^(37,38).

La microbiota 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* sp y *Escherichia coli*, agentes capaces de generar infecciones del tracto intestinal con importantes repercusiones negativas en los parámetros productivos⁽³⁹⁾. 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⁽⁴⁰⁾. Por el contrario las poblaciones de bacterias benéficas está representada fundamentalmente por *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, 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⁽³⁰⁾.

2.2.2. Bacterias patógenas en el TGI en aves

Collett⁽⁴¹⁾ describe tres mecanismos específicos que causan enfermedades a nivel del 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 aminos como histamina y cadaverina⁽⁴²⁾, toxinas que causan un recambio celular en el epitelio intestinal, explicando su efecto sobre el grosor de la pared intestinal y la muerte celular⁽⁴³⁾. 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 y tercero, organismos enteropatógenos que causan lesiones, destrucción de las microvellosidades y destrucción de la barrera bacteria - huésped o del citoesqueleto. Por 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*⁽⁴⁴⁾. 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⁽⁴⁵⁾.

La reducción de las bacterias totales por efecto de los APC sintéticos o naturales conducen a disminución de la actividad del sistema inmune intestinal, lo cual libera energía para procesos metabólicos relacionados con el crecimiento⁽⁴⁶⁾. En consecuencia, el uso de APC permite obtener mayor disponibilidad de nutrientes, principalmente de energía y aminoácidos⁽⁴⁷⁾.

A. *Escherichia coli* en aves

La bacteria *Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885, considerándose como hospedero natural del tracto entérico tanto en el animal como en la persona. Desde el año 1950 comenzó a asociarse como agente etiológico de enfermedades como

enteritis, infecciones urogenitales entre otras patologías, convirtiéndose en un problema importante de salud pública. No obstante, se han descrito diversos patotipos de *E. coli*, de los cuales no todos están asociados a patologías, ni de la misma severidad. Aunque es normalmente considerada como etiología de enfermedades transmitidas por alimentos, asociada a contaminación con materia fecal; algunos patotipos son capaces de producir infecciones zoonóticas. Dentro de esta categoría se encuentra el patotipo de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), al cual se le atribuyen diversos brotes de enfermedad en humanos asociados a contacto directo con animales. Lo anterior significa un grave problema de salud pública, particularmente en áreas laborales con contacto estrecho con animales o también animales en contacto con descarga de aguas tratadas⁽⁴⁸⁾. *Escherichia coli*, es una de las bacterias más importantes en la avicultura perteneciente al grupo de los Gram negativo^(49,50), causante de la colibacilosis aviar y de cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial⁽⁵¹⁾.

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^(52,53) y por tanto, se elimina al exterior por las heces. Según Garrity *et al.*⁽⁵⁴⁾ el género *Escherichia* está incluido dentro del *Filum Proteobacteria*, Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales, y Familia *Enterobacteriaceae*, cuyas características generales propuestas por 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* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* productora de shigatoxinas o verotoxinas (STEC/VTEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)⁽⁵⁵⁾.

Los patotipos ETEC se caracterizan por producir fimbrias adhesivas y enterotoxinas, las cuales se clasifican en termoestables o termolábiles⁽⁵⁶⁾. ETEC es causante 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⁽⁵⁷⁾.

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.⁽⁵⁷⁾

Se desconoce aún el mecanismo patológico de EAEC⁽⁵⁶⁾, aunque se ha asociado con diarrea crónica. In vitro se adhieren a células, formando un patrón agregativo, y ciertas cepas producen enterotoxinas termoestables⁽⁵⁷⁾.

Los patotipos EIEC producen enfermedad en humanos 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⁽⁵⁷⁾. Produce una diarrea con presencia de sangre y moco, y se asocia a consumo de agua o alimentos contaminados⁽⁵⁶⁾.

El patotipo (STEC o VTEC), se caracteriza por producir shiga toxinas o verotoxinas⁽⁵⁵⁾. 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*⁽⁵⁷⁾. 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⁽⁵⁸⁾.

2.2.3. 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⁽⁵⁹⁾. La microflora benéfica está representada fundamentalmente por *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, 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⁽³⁰⁾. Ante esto el mantenimiento de la

salud intestinal depende entonces de una íntima pero armoniosa relación entre los microorganismos⁽⁶⁰⁾ y este balance afecta el comportamiento del pollo de engorde⁽⁶¹⁾. 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⁽⁶²⁾ y la segunda que reconoce al conocimiento de la microbiota normal como fundamental punto de partida para evaluar cambios en la composición y efectividad del uso de APC en pollos de engorde^(24,62). En ambos casos, un mejor acercamiento al monitoreo molecular de la microbiota intestinal, abre amplias posibilidades para manipular la microbiota, con beneficios para la salud del huésped⁽⁶³⁾.

Principalmente se utilizan bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* como probiótico, que pueden estar conformados por un solo tipo de microorganismo o por combinaciones de estos, con el fin de lograr mayor eficiencia al colonizar el intestino⁽⁶⁴⁾. Estos tipos de bacterias en su metabolismo utilizan carbohidratos como fuente de energía, lo que genera ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico y láctico), los cuales han demostrado poseer propiedades benéficas para la salud del tracto intestinal. Entre esto se puede destacar el ácido butírico, que sirve como fuente de energía para las células del intestino, estimula la proliferación celular, regula la apoptosis y contribuye a mantener la integridad de la pared intestinal⁽⁶⁵⁾. Por otra parte, están las bacterias productoras de ácido láctico; estas son las más utilizadas como probióticos, debido su capacidad para adaptarse y proliferar en las condiciones intestinales, lo que genera múltiples efectos positivos en la salud de las aves⁽⁶⁶⁾.

A. Importancia del *Lactobacillus* spp

El género *Lactobacillus* spp es uno de los predominantes en el ecosistema gastrointestinal de animales de granja⁽⁶⁷⁾. 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⁽⁶⁸⁾. El estudio de Roldán *et al.*⁽⁶⁹⁾ puso de manifiesto la inhibición de este patógeno a partir de cepas de *L. casei* aisladas de un alimento cárnico fermentado.

Vinderola y Reinheimer⁽⁷⁰⁾ también proponen el uso de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de sustancias antimicrobianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices⁽⁶⁸⁾. Otras investigaciones demuestran que las BAL pueden presentar actividad antagónica al enfrentarlas a cepas patógenas como *Salmonella enteritidis*^(71,72). Las BAL tienen la capacidad de producir bacteriocinas, sustancias que poseen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias con potencial patógeno. Una de las más comunes es la Nisina; esta ha demostrado efectos positivos en la eliminación de microorganismos patógenos importantes para la avicultura⁽⁷³⁾.

Lactobacillus spp pertenece a las bacterias ácidos lácticas (BAL) ubicadas en el grupo de las bacterias Gram positivas, siendo la mayoría bacilos delgados 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⁽⁷¹⁾.

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-Meyerhoff (glucólisis) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ 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^(71,74). 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 humano, no ser patógenos ni tóxicos, deben sobrevivir al ambiente ácido y a las sales biliares del duodeno, además de presentar una capacidad de adherencia a las células epiteliales y deben adaptarse a la flora intestinal sin desplazar a los microorganismos nativos, deben producir sustancias antimicrobianas y mejorar las funciones inmunes. Estas son las características que debe presentar un probióticos, y muchas de las BAL las cumplen⁽⁷⁵⁾.

A.1. Mecanismo de acción contra bacterias no 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 hidrogeno. Además otro factor al cual es atribuida esta característica es la producción de bacteriocinas⁽⁷⁴⁾.

Las bacteriocinas son sustancias extracelulares diferentes a los antibióticos, que son producidas de forma natural por algunas especies bacterianas como *Lactobacillus*, estas bacteriocinas exhiben una actividad inhibitoria frente a diferentes especies alterantes o patógenas⁽⁷⁶⁾. Se han obtenido diferentes bacteriocinas producidas por BAL, y estas presentan efectos 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 *Salmonella spp*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*,⁽⁷⁷⁾. La administración oral de *Lactobacillus* ha demostrado la capacidad de disminuir la población de *Salmonella enteritidis* en la cloaca, lo cual disminuye la probabilidad de que los huevos sean contaminados por esta bacteria⁽⁷⁸⁾.

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.

2.2.4. 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 las porciones de todo el tracto gastrointestinal⁽⁷⁹⁾. Estudios llevados a cabo hace algunos años mostraron que el TGI de las aves esta colonizado por cerca de 640 especies bacterianas que pertenecen a 140 géneros diferentes⁽⁸⁰⁾.

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 microorganismos 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.
- 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⁽⁸¹⁾.

Las aves poseen una resistencia natural e inmunidad un tanto limitadas contra la colonización e infección desarrollada especialmente por microorganismos potencialmente patógenos, Ghosh S *et al.*⁽⁸²⁾ 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⁽³¹⁾ y el manejo y cuidado de las personas encargadas. Según Van Der Wielen P *et al.*⁽⁸³⁾ 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.

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⁽⁸⁴⁾.

De acuerdo con Lu *et al.*⁽³⁸⁾ los grupos que predominan en la comunidad bacteriana intestinal del pollo son los pertenecientes a *filos Actinobacterias* y *Firmicutes*, *filo Proteobacterias* y *filo Bacteroides*. Estudios recientes Wei *et al.*⁽⁸⁵⁾ 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*, los cuales se encuentran más abundantes tanto en íleon como en ciego

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⁽⁸⁶⁾. La densidad bacteriana en el íleon de pollitos de engorde 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⁽⁸⁰⁾.

2.2.5. 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⁽⁸⁷⁾. Sin embargo, la cutícula que protege la cáscara de huevo puede degradarse, lo que provoca que los microorganismos penetren para llegar a las estructuras internas del mismo⁽⁸⁸⁾. 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^(91,93). Los estudios de *Salmonella* y *Mycoplasma* han demostrado que las bacterias pueden estar presentes dentro del ovario. Es posible 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⁽³⁸⁾. La detección de especies relacionadas con *Clostridium*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus* indica que estos organismos pueden transmitirse verticalmente de gallinas a polluelos incluso en condiciones comerciales de aves de corral.

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⁽⁹²⁾.

El consumo de agua y alimentos resulta en una rápida adquisición de microorganismos adicionales y, 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⁽²⁴⁾. 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⁽⁹³⁾. 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⁽⁹⁴⁾ cuando el ambiente intestinal cambia rápidamente y la microbiota es menos diversa e inestable.

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 en el intestino del pollo bebé. 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⁽³⁸⁾, 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, especialmente si las aves se crían en camas profundas⁽⁹⁵⁾, mientras que, a los 7 días de edad los polluelos contienen una microbiota de la mucosa ileal dominada principalmente por *Lactobacillus*, seguida de

Enterococcus. Después de la segunda semana de vida, el intestino delgado y el ciego desarrollan comunidades claramente diferentes.

c) Fase de engorde

Nakphichit *et al.*,⁽⁹⁶⁾ observaron que el organismo más abundante en el intestino delgado era *Lactobacillus spp* cuya diversidad aumentó de 21 a 42 días de edad. Estos estudios revelan que aunque *Lactobacillus spp* domina la microbiota del intestino delgado, hay una sucesión de especies y cepas que dependen de la edad de las aves. Lu *et al.*⁽³⁸⁾, 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⁽⁹⁷⁾.

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)⁽²⁴⁾.

2.2.6. Microbiota en aves según órganos del TGI

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 spp* 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*. Otras secuencias relacionadas con la familia *Clostridiaceae* representan el 9,7% del total. De los 7 a 21 días de edad las especies de los géneros *Lactobacillus*, *clostridium*, *Streptococcus* y *Enterococcus* son las dominantes.⁽³⁸⁾

Por otra parte Dumonceaux *et al.*,⁽⁹⁸⁾ observó que aproximadamente el 90% de la microbiota del intestino delgado de pollos está compuesta por *Lactobacillus spp*. Lu *et al.*,⁽³⁸⁾ determinó que el 70% de las secuencias del íleon eran *Lactobacillus spp*, 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⁽⁸¹⁾

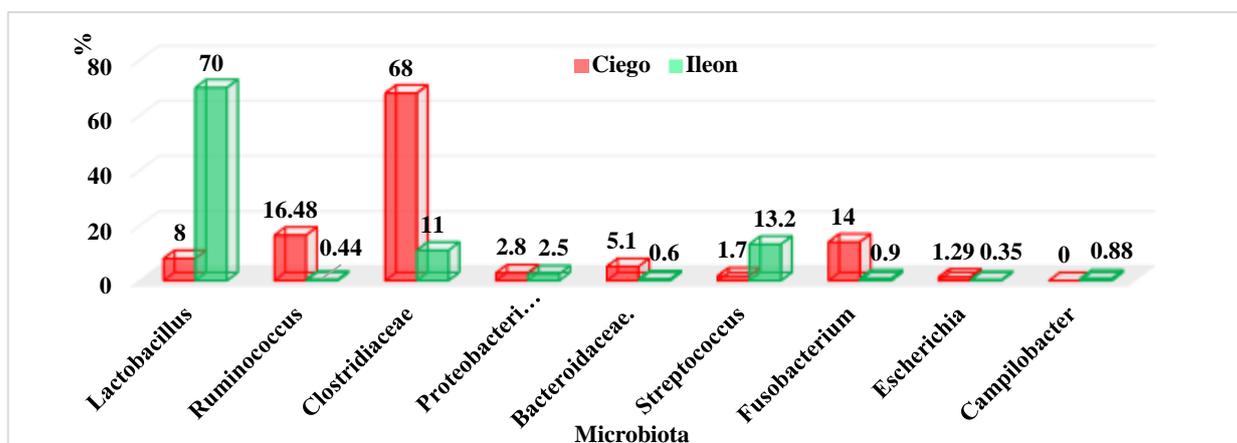
B. Microbiota en ciego de aves.

El ambiente cecal alberga predominantemente los *Phylum Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, la mayoría de los cuales son anaerobios estrictos⁽⁹⁹⁾

El grupo más abundante de este tramo del intestino es la familia *Clostridiaceae*, con aproximadamente un 60%. Las bacterias pertenecientes al grupo de las *Actinobacterias* ocuparían un 13,9% también 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. Estudios recientemente desarrollados⁽⁸⁵⁾ sugieren que el número de *Firmicutes* en este tramo intestinal ascendería a un 78% del total, mientras que los *Bacteroides* ocuparían un 11%.

Por otro lado, Van der Wielen *et al.*,⁽⁸³⁾ 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.

Figura 2. Composición de la microbiota en el íleon y ciego en pollos



Fuente: Lu J, et al.,(38)

2.2.7. Zapallo

El zapallo (*Cucurbita moschata*) es una planta que pertenece a la familia de las cucurbitáceas, cuyo fruto se cultiva de forma tradicional en Colombia; con composición nutricional de proteína bruta 8,12%, extracto etéreo 2,85%, extracto libre de nitrógeno 76,6%, fibra bruta 4%, Cenizas 8,4%; tiene propiedades energéticas que pueden aprovechar los animales^(100,101).

El fruto de zapallo, se caracteriza por proveer carotenoides y contiene en su interior numerosas semillas ovales, convexas, lisas, de 2 a 3 cm de largo, las cuales a su vez contienen una pulpa blanca y comestible. Los autores Ortiz.⁽³⁸⁾, Jacobo N, *et al.*⁽³⁹⁾, determinaron un mayor contenido de materia seca en el fruto y otras características agronómicas, sustancias que, en su mayoría, previenen enfermedades carenciales y oncogénicas, en especial, los carotenoides α -caroteno, β -caroteno y Luteína⁽¹⁰⁴⁾

A nivel agroindustrial, resaltan el valor de la harina de esta hortaliza, que radica en su contenido de carbohidratos, fibra y almidones⁽¹⁰⁵⁾

2.2.7.1. Calidad nutricional del zapallo

Según la especie⁽¹⁰⁶⁾, el zapallo se caracteriza por su composición química rica en proteína, almidón y con contenidos de aceite que van desde el 30% al 50%. Si se incluye el fruto de zapallo en las raciones de los ABA (alimentos balanceados para animales), se ganará en calidad nutricional, pues no solo aporta energía, sino también proteína (cuando menos 15%) y carotenos totales. Las semillas de zapallo tienen actividad farmacológica tales como: antidiabético, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatorio y efectos antioxidantes⁽⁸⁾. Usada en los trastornos de las vías urinarias, cálculos renales, cáncer de seno y metástasis (mejora la supervivencia de los enfermos de cáncer), enfermedades del corazón, endurecimiento de las arterias, colesterol, presión arterial, trastornos inflamatorios (reducir la inflamación de las articulaciones en caso de artritis, espondilitis y edemas), prevención de la diabetes, desequilibrio metabólico y obesidad. Por su alto contenido en zinc es muy recomendado para prevenir la osteoporosis. Por su alto contenido en vitaminas A y E es buen antioxidante. Las semillas y el aceite de zapallo son muy eficaces a la hora de expulsar parásitos intestinales como la solitaria; también eliminar las mucosidades en las paredes de los pulmones, garganta y bronquios⁽¹⁰⁷⁾

Tabla 1. Composición química del fruto de zapallo en 100 g.

Componentes	Unidad	Zapallo (<i>Curcubita maxima</i>)
Energía	Cal	21
Agua	g	92
Hidratos de carbono	g	2.2
Fibra	g	0.5
Proteína	g	0.6
Lípidos	g	4.2
Sodio	mg	3
Potasio	mg	300
Calcio	mg	24
Fosforo	mg	28
Hierro	mg	0.60
Zinc	mg	400
Vitamina A (Retinol)	ug	90
Vitamina B1 (Tiamina)	mg	0.03
Vitamina B2 (riboflavina)	mg	0.04
Vitamina B3 (Niacina)	mg	13 M.O
Vitamina C	mg	22
Componentes	Unidad	Zapallo (<i>Cucurbita maxima</i>)
Energía	Cal	21
Agua	g	92
Hidratos de carbono	g	2.2
Fibra	g	0.5
Proteína	g	0.6
Lípidos	g	4.2
Calcio	mg	24
Fosforo	mg	28
Hierro	mg	0.60
Zinc	mg	400
Vitamina A (Retinol)	ug	90
Vitamina B1 (Tiamina)	mg	0.03
Vitamina B2 (riboflavina)	mg	0.04
Vitamina B3 (Niacina)	mg	13 M.O
Vitamina C	mg	22

Fuente: Camasca citado por González D, Yañez Y, Villacres M.(108)

Su efecto antiinflamatorio también beneficia a las personas con tendencia a irritación o inflamación de la vejiga. El beneficio más importante de la semilla de zapallo es la prevención del crecimiento y reducción del tamaño de la próstata⁽¹⁰⁷⁾

Tabla 2 .Composición química de semilla de *Cucurbita maxima*

Composición química (g/kg)	
Grasas	524,34
Carbohidratos	129,08
Proteínas	274,85
Fibra	161,54
Ceniza	44,22
Humedad	27,51
Tocoferoles (mg/kg)	
α -Tocoferol	20,79
γ -Tocoferol	28,70
β -Caroteno	31,40
β -Criptoxantina	0,21
Ácidos grasos (% grasa)	
Ácido α - linolenico (18:3n-3)	0,24
Ácido linoleico (18:2)	56,60
Ácidos grasos saturados	17,47
Ácidos grasos monoinsaturados	14,90
Ácidos grasos poliinsaturados	56,84
Aminoácidos (mg/kg)	
Lisina	9,94
Metionina	4,96
Treonina	6,86

Fuente: Mi et al.(109)

2.2.7.2.Cucurbitacinas

Las cucurbitacinas son triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados encontrados principalmente en la familia *Cucurbitaceae* y aislados en los géneros de: *Acanthosicyos*, *Benicasa*, *Brandegea*, *Bryonia*, *Cayaponia*, *Citullus*, *Coccinia*, *Coralocarpus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Ecballium*, *Echinocystis*, *Fevillea*, *Gerrardantus*, *Gurantia*, *Hemsleya*, *Kedrostis*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Marah*, *Melathria*, *Momordica*, *Peponium*, *Sicyos*, *Telfaria*, *Trichosanthes*, *Trochomeria*, y *Wilbrandia*.

Las cucurbitacinas agliconas aisladas de varias especies de plantas han dado el nombre general de *cucurbitacinas*. Las diferentes *cucurbitacinas* han sido especificadas por letras de la A hasta la T. Algunas cucurbitacinas son llamadas también por sus nombres comunes. La primera *cucurbitacina* aislada como una sustancia cristalina, elaterina, no fue descrita y mostrada estructuralmente.

Las plantas que contienen cucurbitacinas tienen roles importantes en la medicina tradicional como propiedades, anti-inflamatorias, antifebril, antihelmíntica y antimicrobianas.⁽⁹⁾

2.2.7.3. Actividad antimicrobiana del zapallo

El extracto de semilla de *Cucurbita maxima* fue estudiado para actividad antibacteriana empleando el método del cilindro estándar.

Los microbios utilizados fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus weneri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas Aeruginosa*, y *Escherichia coli*. La zona de inhibición registrada para diversos organismos fue, *Staphylococcus aureus* (16mm), *Pseudomonas putida* (16mm), *Pseudomonas aeruginosa* (16 mm), *Escherichia coli* (16 mm). Actividad del extracto etanólico de la semilla de la planta se comparó con la amikacina estándar (25 µg). El extracto de semilla de *Cucurbita maxima* exhibió buena actividad antimicrobiana.⁽⁷⁾

2.2.8. Orégano

Origanum vulgare pertenece a la familia de las *Lamiaceae*. Es originaria de Eurasia occidental y el suroeste y la región mediterránea, y se encuentra distribuida en los cinco continentes⁽¹¹⁰⁾.

El género orégano es uno de los grupos de plantas más estudiado de la familia *Labiatae*, por lo que es ampliamente reconocido sus aceites esenciales, son entre otros los de mayor actividad antimicrobiana, ya que inhiben diversas bacterias patógenas, virus y hongos. Adicionalmente, se relacionan múltiples propiedades favorables para la salud humana así: antiparasitarias, diaforéticas, antiespasmódicas, tónicas, sedativas,

digestivas, carminativas, emenagogo, analgésicas, expectorantes, antidisentéricas, antirreumáticas, antihemorroides, antipirético, contra la tos y bronquitis, entre otras⁽¹¹¹⁾.

El orégano tiene cerca de 30 diferentes especies de plantas, de las cuales se relacionan cuatro, las comúnmente utilizadas, el griego (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*), el español (*Coridothymus capitatus*), el turco (*Origanum onites* L.) y el mexicano (*Lippia graveolens*)⁽¹¹²⁾. Oliver⁽¹¹³⁾ simplifica y generaliza la aproximación y reconoce básicamente dos tipos de orégano, el *Origanum vulgare* L. y sus especies relacionadas, nativos de la región del Mediterráneo y el género *Lippia* nativo de América tropical, subtropical y África. Esta planta se caracteriza por crecer en ambientes marginales y controlar la erosión debido a la estructura de sus raíces, por lo que puede ser usado para la preservación del suelo⁽¹¹⁴⁾.

En este sentido, la más importante característica de estos derivados de plantas medicinales es que son seguros, ya que el orégano es categorizado como GRAS (Generalmente reconocido como seguro) por la FDA de Estados Unidos⁽¹¹⁵⁾. Los efectos multifuncionales de orégano son la excelente capacidad antioxidante, antimicrobiana, antimutagénico, anticancerígeno y antiparasitario, su capacidad para ligar progesterona y ligera actividad estrogénica es evidente, aumenta la actividad de la enzima glutatión α -transferasa, lo que sugiere un potencial anticarcinogénico, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, antidiarreico, antifúngico, anti infecciosones cutáneas, contra desórdenes hepáticos, diurético, antihipertensivo, desordenes menstruales, antimaláricas, antiespasmódico, enfermedades respiratorias, diabetes y abortivo⁽¹¹⁶⁾.

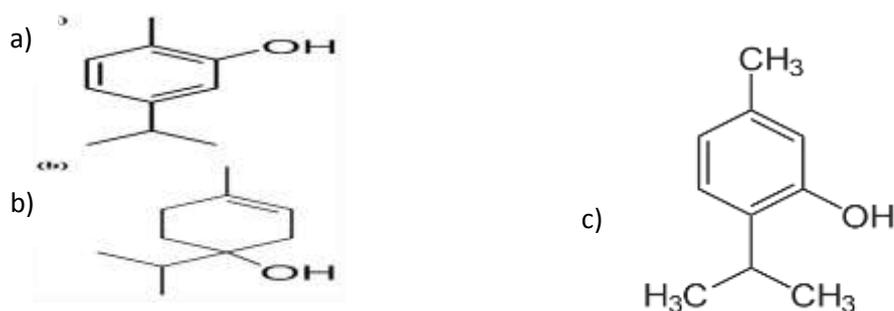
2.2.8.1. Composición química del orégano (*Origanum vulgare*)

El análisis de la composición del orégano presenta con diferencias cuantitativas significativas a los fenoles isoméricos, el carvacrol (0,1 -56,6%) o fenol no cristalizable y el timol (7,9-53,6%) o fenol cristalizable; incluyendo sus precursores biosintéticos, el γ -terpineno y el p-cimeno. En muestras de *L. graveolens* Kunth, procedentes de Jalisco, se reportó un contenido de timol superior al 30%⁽¹¹⁷⁾. En contraste, Vernin *et al.*,⁽¹¹⁸⁾ encontraron 45 compuestos que constituyeron el 92%-93% del aceite esencial de orégano; cuyos componentes principales fueron el carvacrol (71%) y el timol (5%). Como se puede observar, se estiman tantas composiciones en el AEO. En términos

generales, se sugiere que un buen AEO en el contexto multifuncional, es aquel que contiene al menos 55% de carvacrol + timol⁽¹¹⁹⁾; sin embargo, a pesar de que estos dos metabolitos presentan efectos antioxidantes y antibacterianos, se ha dado mayor énfasis al carvacrol, debido los hallazgos experimentales, con este quimiotipo de orégano.

Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. El efecto antimicrobiano del AEO (aceite esencial de orégano) se debe principalmente a la presencia de estos metabolitos: carvacrol y timol y, en menor grado, γ -terpineno y p-cimeno. Estos compuestos dañan la integridad de la membrana celular de las bacterias afectando la homeostasis y el equilibrio de los iones inorgánicos⁽⁵⁾.

Figura 3: Estructura química de componentes principales de *Origanum vulgare*:



Fuente: Govindarajan(120): carvacrol (a), terpineno-4-ol (b), timol (c)

Diversos estudios atribuyen los múltiples efectos de los AEO a sus dos metabolitos secundarios más abundantes: el carvacrol y el timol. Estos metabolitos han demostrado un efecto antibacterial contra una amplia gama de bacterias, no así ocurre con los precursores γ -terpineno y el p-cimeno⁽¹²¹⁾; en contraste, Nitsas⁽¹¹⁹⁾ afirma que aparentemente, el timol es más efectivo que el carvacrol contra bacterias Gram-negativas.

2.2.8.2. Actividad antimicrobiana del Orégano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* ^(122,123)

Según Sivropoulou A, *et al.*⁽¹²¹⁾, tienen además una capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo.

Elgayyar M, *et al.*⁽¹²²⁾ y Aligiannis N, *et al.*,⁽¹²³⁾ señalan que los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos. En el caso de *E.coli* O157:H7 existe una relación concentración/efecto a 625 ml/L con actividad bactericida después de 1 minuto de exposición al aceite, mientras que después de 5 minutos se requirieron 156 y 312 ml/L. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos.

Ultee *et al.*,⁽¹²⁴⁾ concluyeron que esta actividad se basa en la alteración de la integridad de la membrana, la cual tiene un gran impacto sobre el sistema de transducción de energía, disminuyendo la cantidad de ATP intracelular a valores cercanos a cero. Otros efectos que pueden estar relacionados con la acción bactericida o bacteriostática son una reducción en la síntesis de ADN y reducción de la actividad metabólica de la bacteria. A pesar de que los estudios sobre la actividad antibacteriana in vitro de los AEO son concluyentes, se conoce muy poco acerca de los efectos multifuncionales in vivo, principalmente, sobre la dinámica de la microflora intestinal en respuesta a la suplementación y nivel de los metabolitos secundarios: carvacrol y timol.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

- ❖ Rojo de metileno
- ❖ Reactivo de Kovacs
- ❖ Placas Petri
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Matraz
- ❖ Pipeta
- ❖ Probeta
- ❖ Mechero
- ❖ Gradilla
- ❖ Ron de quemar
- ❖ Viales
- ❖ Asa de siembra en argolla.
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Jeringas
- ❖ Estufa
- ❖ Horno
- ❖ Autoclave
- ❖ Algodón
- ❖ Estuche de disección
- ❖ Balanza
- ❖ Bolsas herméticas
- ❖ Mascarilla, guantes, redcilla
- ❖ Alcohol, yodo.
- ❖ Hilo (nylon)
- ❖ Bisturí

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

400 Pollos Cobb 500

3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO:

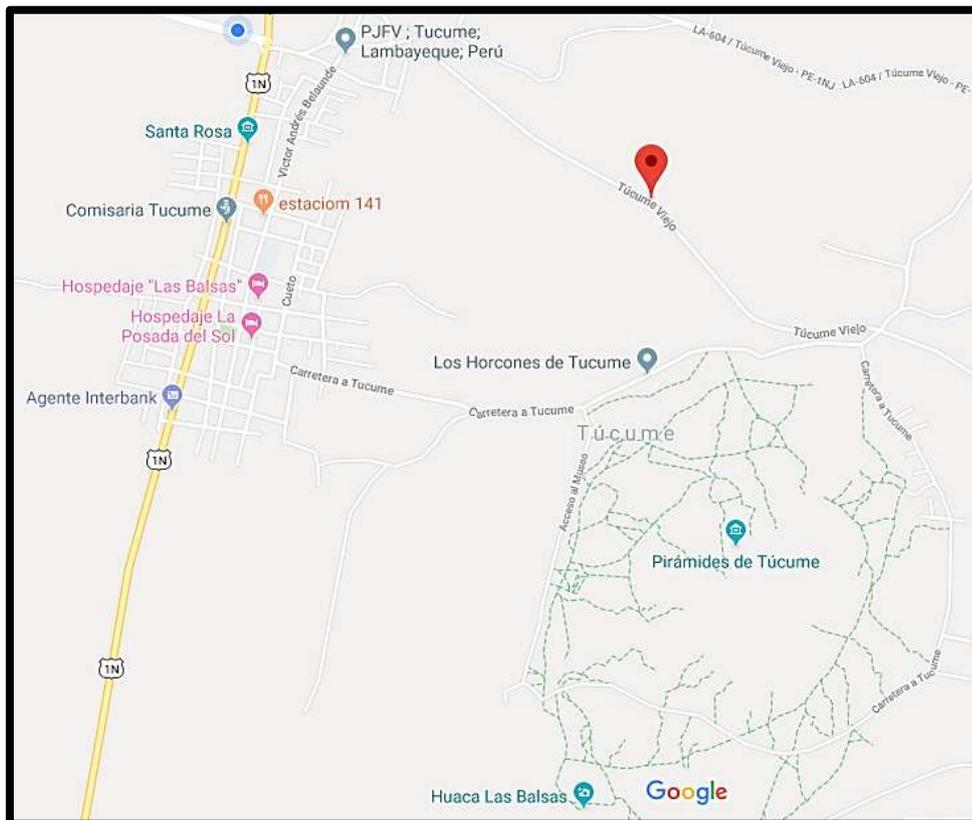
- ❖ Agar cromogénico TBX (Tryptona Bilis X-Glucoronida)
- ❖ Agar Man rogoso MRS
- ❖ Agar peptona
- ❖ Agua destilada
- ❖ Caldo glucosado
- ❖ Triple Sugar Iron (TSI)
- ❖ Agar Lisina Hierro (LIA)
- ❖ Agar Citrato De Simmons
- ❖ Caldo MRS
- ❖ Cloruro de sodio 2%
- ❖ Cloruro de sodio 4%
- ❖ Glucosa 1%
- ❖ Lactosa 1%
- ❖ Sacarosa 1%
- ❖ Manitol 1%
- ❖ Arabinosa 1%

3.2. DISEÑO METODOLOGICO.

3.2.1. UBICACIÓN GEOGRAFICA

La investigación se realizó en un galpón experimental en el distrito de Túcume, departamento y provincia de Lambayeque, ubicada a 6°30'22" latitud sur y 79°51'26" latitud oeste. La crianza de los pollos abarcó desde el mes de diciembre del 2018 hasta enero 2019, con una temperatura de 29 - 31°C. La latitud sobre el nivel del mar es de 46 m⁽¹²⁵⁾; 85 % de humedad relativa; 41 mm de precipitación. La variación en la precipitación entre los meses más secos y más húmedos es 25 mm ⁽¹²⁶⁾.

Figura 4. Mapa satelital del lugar de estudio: Túcume – Lambayeque.



Fuente: Googlemaps⁽¹²⁷⁾

3.2.2. Galpón experimental.

Se construyó un galpón experimental, con anticipación a la llegada de los pollos, realizándose actividades como fumigación y se dejó secar por 24 horas para posteriormente rociar cal a todo el piso dejándose por un periodo de 15 días, luego se introdujo cama a base de pajilla de arroz con 10 cm de profundidad y se instaló comederos y bebederos tipo tolva para cada tratamiento el cual fueron identificados.

3.2.3. Semilla de zapallo y orégano

Las semillas de zapallo (*Cucurbita maxima Duchesne*) fueron adquiridas en el mercado Moshoqueque, ubicado en el distrito de Chiclayo. Se almacenaron a temperatura ambiente y luego fueron sometidas a molienda con molino de martillos.

3.2.4. Análisis bromatológico de harina de semilla de zapallo y harina de orégano

La composición bromatológica y el fraccionamiento de la fibra de harina semillas de zapallo y harina de orégano se analizaron en el laboratorio 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 6)

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 zapallo, ni harina de orégano) y 3 grupos experimentales los cuales fueron; T1 (10% de Harina de semilla de zapallo y 0.5% de Harina de órgano), T2 (10% de Harina de Zapallo y 1% de Harina de orégano) y T3 (10% de harina de zapallo solamente) para las tres fases de producción: Inicio, Crecimiento y Acabado (Anexo 7,8,9)

3.2.6. Necropsia

Se usó la siguiente técnica teniendo en consideración a Perusquía⁽¹²⁸⁾:

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.

3.2.7. Análisis de la muestras.

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

- ❖ Luego se realizó la preparación de los siguientes agares según lo establecido por Guerra y Agurto⁽¹²⁹⁾ para realizar el sembrado.

a) Para *Escherichia coli*

Agar cromogénico TBX (Tryptona Bilis X-Glucoronida)

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

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

b) Para *Lactobacillus spp*

Agar Man Rogoso MRS

Se disolvió 62.5 gr de agar MRS en 1 litro de agua destilada (deshionizada). Luego se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121°C.

- ❖ Se procedió a la preparación de las siguientes diluciones para luego realizar el sembrado:
 - ✓ Se preparó la primera dilución 10^{-1} : 10 g de muestra (segmento del TGI) y 90 ml de agua peptonada. Se colocó cada segmento del TGI (duodeno, yeyuno, íleon, ciegos y colon)
 - ✓ Luego se extrajo 1ml de la primera dilución 10^{-1} y se colocó en la segunda dilución 10^{-2} (9 ml de agua peptonada)
 - ✓ Se volvió a extraer 1ml de la segunda dilución y se colocó en la tercera 10^{-3} dilución y de esta se volvió a extraer 1 ml para colocar en la cuarta dilución 10^{-4} .
 - ✓ Para el caso de *Lactobacillus spp*, se realizó una dilución más 10^{-5} .
- ❖ Luego se procedió a realizar el sembrado según lo establecido por Guerra y Agurto(129) y se hizo de la siguiente manera:

➤ **Siembra en masa.**

- ✓ Se depositó 1 ml de la muestra de cada dilución en placas Petri estériles, vacías.
- ✓ Se agregó a cada placa 15 a 20 ml del agar cromogénico TBX (*Escherichia coli*) o agar Man Rogoso MRS (*Lactobacillus spp*), previamente fundido y mantenido a una temperatura de 74°C

- ✓ Luego se realizaron movimientos circulares sobre la superficie de la mesa a las placas Petri debidamente tapadas (siempre sin levantar la placa de la mesa). Con esto se consigue mezclar el inóculo con el agar.
 - ✓ Se dejó solidificar el agar a temperatura ambiente (esperar al menos media hora) y luego se llevaron las placas a incubar (la temperatura y el tiempo de incubación elegidos varían según el tipo de microorganismo).
 - ✓ Se procedió a la incubación en la estufa: *Escherichia coli*: 45°C por 24 horas y *Lactobacillus spp*: 37°C por 48 horas.
 - ✓ Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido en la masa del agar. Se eligió de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 3000 colonias/placas (esto proporciona una precisión estadística suficiente).
- ❖ Recuento de Unidades formadores de colonias (UFC) en placa Petri, según lo sugerido por Guerra y Agurto⁽¹²⁹⁾.
 - ✓ Para realizar el recuento, se puso la placa de Petri con la base hacia arriba y, marcando con un lápiz grueso se divide los sectores a lo largo de los diámetros de colonias, por toda la placa o también se realiza el conteo por cuadrantes.
 - ✓ El número de unidades formadoras de colonia o UFC/g (o ml en muestras líquidas) de la muestra original será:

Número de UFC/g= Número de colonias x factor de dilución

3.2.8. 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 + → 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 + → 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

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 + → 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

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.

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

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

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*))

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.

❖ Identificación de *Lactobacillus spp*

Los lactobacilos son muy exigentes nutricionalmente, debido a que necesitan factores de crecimiento.

Preparación para pruebas bioquímicas de *lactobacillus spp*:

- 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 verter 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

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. METODO ESTADISTICO

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 3. *Escherichia coli* (10^4 UFC gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 7.

Tracto	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)			
	0% HSZ y		10% HSZ y	
	0% HO	0.5% HO	1% HO	10% HSZ
Duodeno	71.60±1.14 ^a	44.60±3.05 ^d	53.20±2.28 ^c	66.40±2.41 ^b
Yeyuno	71.80±1.64 ^a	50.00±3.16 ^d	57.20±1.92 ^c	65.60±2.61 ^b
Íleon	73.60±2.07 ^a	46.40±3.58 ^d	57.00±2.55 ^c	66.80±2.17 ^b
Ciegos	84.20±1.30 ^a	66.00±2.55 ^c	67.00±1.58 ^c	73.20±3.19 ^b
Colon	86.60±1.14 ^a	68.80±0.84 ^d	72.00±1.58 ^c	77.00±1.00 ^b

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a $p < 0.01$

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 7, en la primera fase (0 – 7 días), se sacrificaron a pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO) para evaluar su poder antibacteriano contra *Escherichia coli* (10^4 UFC/g) encontrando 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 10% HSZ y 0.5% HO con respecto a los demás grupos experimentales. además en el T3 en la que se usó solo HSZ al 10% hubo una reducción altamente significativa de *E. coli* con respecto al tratamiento control, resultado similar a lo publicado por Del Castillo et al.,⁽¹⁸⁾ en la que empleó extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* en donde logró inhibir significativamente el crecimiento de *E. coli* in vitro, corroborando el efecto antimicrobiano en nuestra investigación in vivo (buscar en antecedentes). De igual manera Ravishankar, K.⁽⁸⁾ demostró que el extracto de semilla de *Cucurbita máxima*, tuvo una buena actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, encontrando una zona de inhibición al utilizar diversas dosis de aceite de Cucurbita maxima: 100 mg/ml (12 ± 2.29), 200 mg/ml (16 ± 1.68); así como también El Zawane Kamarudin, Q. et al.,⁽¹⁹⁾ demostraron el potencial antibacteriano in vitro de la cáscara de *Cucurbita moschata Duchesne* “calabaza tropical” reduciendo el diámetro de inhibición contra bacterias patógenas; para el caso de *E. coli* se redujo el diámetro de inhibición a 12 ± 2.8 comprobando de esta manera su poder antimicrobiano.

En esta investigación al alimentarse los pollos con harina de zapallo y de orégano se obtuvo la reducción de colonias de *E. coli* en todos los segmentos del intestino (duodeno, yeyuno, ileon, ciego y colon); debido al efecto sinérgico de los dos insumos empelados, por una parte el zapallo el cual está compuesto por las cucurbitacinas, triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados⁽¹³⁰⁾ que pertenecen a la familia de las cucurbitáceas donde está incluido el zapallo^(100,101). En el caso del orégano considerado como una planta de mayor actividad antimicrobiana⁽¹¹¹⁾; debido a sus componentes principales como el carvacrol (71%)⁽¹³¹⁾, timol (18.80%) y el γ -terpineno-4-ol (28,70%)^(110,132) teniendo estos metabolitos un efecto antimicrobiano contra una amplia gama de bacterias.

Tabla 4. *Escherichia coli* (10^4 UFC gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 22.

Tracto	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)			
	0% HSZ y 0% HO	10% HSZ y 0.5% HO	10% HSZ y 1% HO	10% HSZ
Gastrointestinal				
Duodeno	73.20±1.92 ^a	25.20±3.49 ^d	34.00±3.08 ^c	44.60±2.30 ^b
Yeyuno	73.80±1.48 ^a	35.20±3.11 ^d	43.80±2.77 ^c	54.00±2.55 ^b
Íleon	75.40±1.67 ^a	25.00±2.24 ^d	33.60±3.36 ^c	45.40±3.21 ^b
Ciegos	83.40±2.07 ^a	40.40±3.85 ^d	50.40±3.36 ^c	59.00±3.16 ^b
Colon	85.40±3.85 ^a	43.20±1.92 ^d	54.80±2.59 ^c	65.20±1.92 ^b

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en la misma fila difieren a $p < 0.01$

Fuente: Elaboración propia.

En la fase de crecimiento en aves la maduración de la microbiota intestinal genera 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⁽²⁴⁾.

En la tabla N° 8, en la segunda fase (7 – 23 días) disminuyó significativamente ($p > 0.01$) la cantidad *Escherichia coli* al incluir en la dieta HSZ 10% y HO 0.5% con respecto a los otros grupos experimentales; comprobando el efecto sinérgico producido por la harina de zapallo y la harina de orégano. Resultados que se justifican en investigaciones realizadas por López, E. A.⁽¹⁴⁾ Al utilizar aceite de orégano (AO) y observar el efecto antibacteriano in vitro, encontrando halos de sensibilidad en la cepa *E. coli*, determinando que el aceite de orégano impide el crecimiento de *E. coli*; de igual manera Roofchae, et al.⁽¹⁵⁾ en su investigación realizada, las poblaciones de *E. coli* fueron significativamente menores al emplear aceite esencial de orégano (AEO) 300 mg / kg (5.10 log UFC/g) y 600 mg / kg (5.11 log UFC/g) en comparación con el grupo control.

Así mismo el grupo alimentado solo con el 10% HSZ redujo la cantidad de *E. coli* en los diferentes segmentos intestinales (Duodeno, Yeyuno, Íleon, Ciego y Colon) con respecto al grupo de los pollos en la que no se le incluyo en su alimentación HSZ ni HO

(Tratamiento control); demostrando así que el zapallo también tiene poder antibacteriano.

Tabla 5. *Escherichia coli* (10^4 UFC gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 42.

Tracto Gastrointestinal	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)			
	0% HSZ y 0% HO	10% HSZ y 0.5% HO	10% HSZ y 1% HO	10% HSZ
Duodeno	73.80±3.11 ^a	5.60±2.88 ^d	15.00±2.91 ^c	25.00±3.00 ^b
Yeyuno	74.40±3.51 ^a	14.20±2.59 ^d	22.80±1.30 ^c	30.20±3.19 ^b
Íleon	77.60±2.07 ^a	5.00±1.58 ^d	14.60±3.21 ^c	24.20±2.17 ^b
Ciegos	84.60±1.14 ^a	20.20±3.19 ^d	30.20±3.19 ^c	38.80±3.70 ^b
Colon	86.00±1.14 ^a	25.40±2.41 ^d	34.80±1.48 ^c	44.40±2.88 ^b

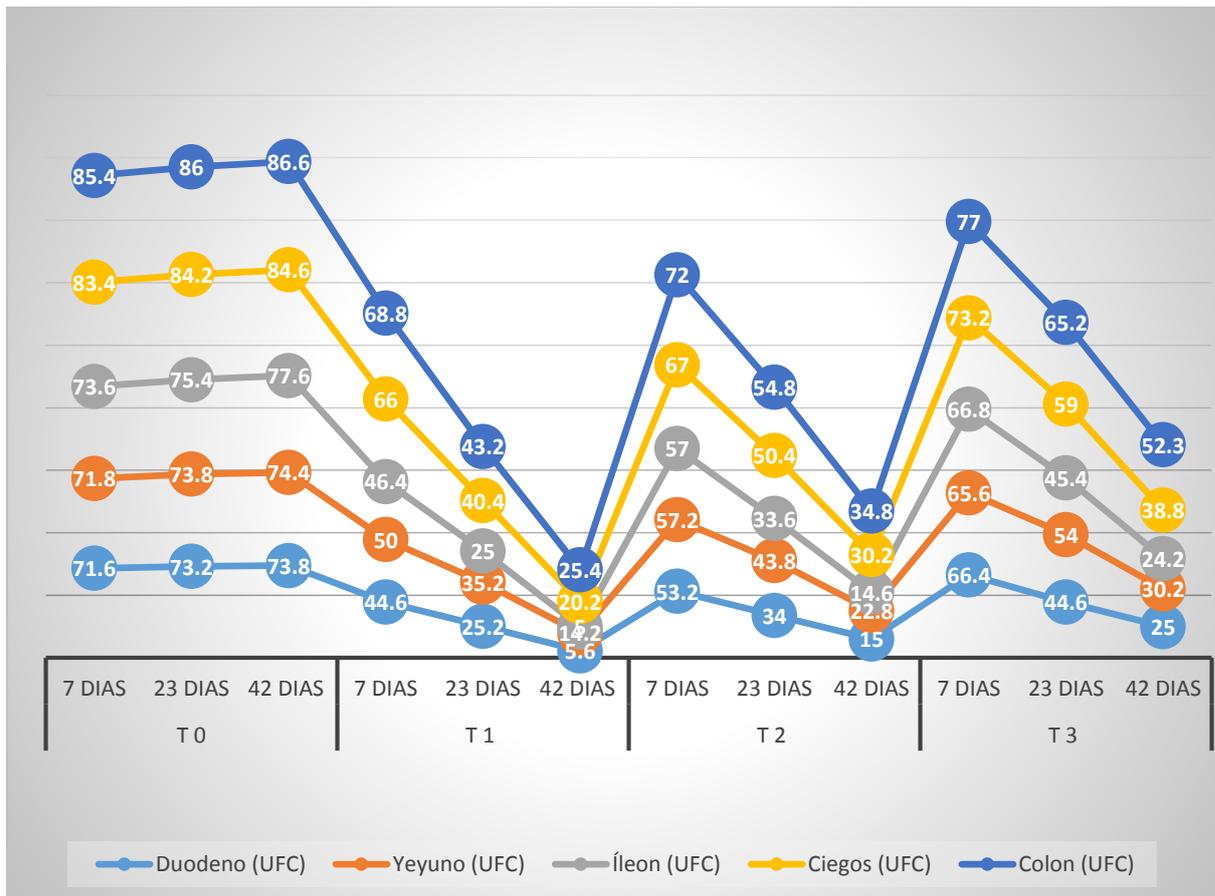
^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a $p < 0.01$

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N°9, en la fase engorde (42 días) se procedió a la evaluación del efecto antibacteriano de la harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano observando la misma tendencia en cuanto a la disminución significativa ($p < 0.01$) 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 10% HSZ y 0.5% HO, demostrando definitivamente el poder antibacteriano de la HSZ y HO en toda la fase productiva de los pollos Cobb 500, gracias al sinergismo de los compuestos fenólicos como las cucurbitacinas del zapallo^(100,101) y del orégano debido a sus componentes principales como el carvacrol, timol y el γ -terpineno^(110,132). Estudios realizado por Nitsas⁽¹¹⁹⁾ afirma que la presencia de γ -terpineno y el p-cimeno en el AEO contribuye a un efecto sinérgico sobre la actividad antimicrobial del aceite; y que el timol es más efectivo que el carvacrol contra bacterias Gram-negativas. Otros autores como Elgayyar M, et al.⁽¹²²⁾ y Aligiannis N, et al.,⁽¹²³⁾ fundamentan lo dicho que la inhibición contra esta bacteria Gram negativa se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos alterando de esta manera la integridad de la membrana, la cual tiene un gran

impacto sobre el sistema de transducción de energía, disminuyendo la cantidad de ATP intracelular a valores cercanos a cero tal como lo indica Ultee et al.,⁽¹²⁴⁾.

Figura 5. *Escherichia coli* (10^4 UFC) en pollos Cobb 500, alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO).



En la figura N° 5, se muestra que en el intestino delgado (duodeno, yeyuno, ileon) y en el inestino grueso (ciegos y colón) hubo disminución significativa ($P < 0,01$) de *Escherichia coli* en el grupo de pollos Cobb 500 alimentados con Harina de zapallo 10% y Harina de oregano 0,5% en todas las fases productivas a los 7 días, 23 días y 42 días siendo este donde hubo más eficacia del poder antibacteriano con respecto a los demas grupos experimentales: T0 (Harina de zapallo 0% Y Harina de orégano 0%), T2 (Harina de zapallo 10% Y Harina de oregano 1%) y T3 (Harina de zapallo 10% y Harina de orégano 0%).

4.2. *Lactobacillus* spp

Tabla 6. *Lactobacillus* spp (10^5 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 7.

Tracto Gastrointestinal	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)			
	0% HSZ y 0% HO	10% HSZ y 0.5% HO	10% HSZ y 1% HO	10% HSZ
Duodeno	10.40±0.55 ^d	13.60±0.55 ^a	12.40±0.55 ^b	11.40±0.55 ^c
Yeyuno	17.40±0.55 ^d	21.80±0.84 ^a	20.40±0.55 ^b	18.80±0.84 ^c
Íleon	23.60±0.56 ^d	28.00±1.00 ^a	26.40±0.55 ^b	24.80±0.84 ^c
Ciegos	5.20±0.45 ^d	8.40±0.55 ^a	7.40±0.55 ^b	6.40±0.55 ^c
Colon	1.10±0.22 ^c	3.40±0.55 ^a	2.40±0.55 ^b	1.40±0.55 ^c

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a $p < 0.01$

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N°10, los resultados de la evaluación de *Lactobacillus* spp en la fase de inicio (0 – 7 días) de pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO), se halló que los segmentos intestinales del Duodeno, Yeyuno, Íleon, Ciego y Colon de pollos alimentados con el 10% HSZ y 0.5% HO tuvo una aumento altamente significativo ($p < 0.01$) en la población de *Lactobacillus* spp con respecto a los demás grupos experimentales; entendiendo que *Lactobacillus* spp, es uno de los microorganismo más abundantes de la microbiota intestinal ⁽³⁶⁾; Su aumento de este se debe al aporte de carbohidratos, aminoácidos por parte de la Harina de zapallo y la harina de orégano (no afecta a las bacterias ácido lácticas) y al combinarlas le proporcionan un alto aporte nutricional que requieren para su crecimiento tal como lo indica Cástulo⁽⁷⁴⁾ y Gómez⁽⁷¹⁾; que este tipo de bacterias lácticas necesitan de un aporte nutricional para su desarrollo y aumento de la población de *Lactobacillus* spp. Además Huda-Faujan et al.,⁽⁶⁵⁾; señala que este tipo de bacterias ácido lácticas juega un papel importante en la detoxificación de ciertos compuestos, crecimiento y protección contra bacterias patógenas (*E. coli*), influyendo directamente en la salud y bienestar del hospedero (pollos de engorde)⁽³⁰⁾.

Tabla 7. *Lactobacillus* spp (10^5 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 22.

Tracto	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)			
	0% HSZ y 0% HO	10% HSZ y 0.5% HO	10% HSZ y 1% HO	10% HSZ
Gastrointestinal				
Duodeno	12.20±0.45 ^d	15.40±0.55 ^a	14.40±0.55 ^b	13.40±0.55 ^c
Yeyuno	17.80±0.84 ^d	25.40±0.55 ^a	23.40±0.55 ^b	21.80±0.84 ^c
Íleon	25.00±0.71 ^c	30.60±0.89 ^a	29.40±0.55 ^a	27.60±0.89 ^b
Ciegos	5.40±0.55 ^d	10.40±0.55 ^a	9.40±0.55 ^b	8.40±0.55 ^c
Colon	2.00±0.71 ^d	5.40±0.55 ^a	4.40±0.55 ^b	3.40±0.55 ^c

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a $p < 0.01$

Fuente: Elaboración propia.

Según Cressman et al., ⁽⁹⁵⁾ señala que a los 7 días de edad los polluelos contienen una microbiota en el íleon dominada principalmente por *Lactobacillus* spp, esta tendencia lo observamos a los 23 días (Fase de crecimiento) en pollos Cobb 500 alimentado con el 10% HSZ y 0.5% HO , teniendo como resultado un aumento significativo ($p < 0.01$) de *Lactobacillus* spp con respecto a los demás grupos experimentales (Tabla 11), notándose también que en el intestino delgado se encontraron mayor cantidad de *Lactobacillus* spp; resultados que concordamos por Nakphichit et al., ⁽⁹⁶⁾ y Salanitro et al. ⁽¹³³⁾, observando que el organismo más abundante en el intestino delgado era *Lactobacillus* spp cuya diversidad aumentó de 21 a 42 días de edad.

En esta investigación también se observó que en el intestino delgado las porciones de Yeyuno e Íleon fueron los que se encontraron la mayor población ($p < 0.01$) de *Lactobacillus* spp con respecto al duodeno, sosteniendo a lo propuesto por Lu et al., ⁽³⁸⁾ que el 70% de las secuencias del íleon eran *Lactobacillus* spp; estos hallazgos son muy importantes ya que 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 ⁽⁸¹⁾, influyendo positivamente en la biodisponibilidad y absorción, mejorando de esta forma el rendimiento productivo en la industria avícola.

En el intestino grueso conformado por el ciego y colon se observó menor población de *Lactobacillus* spp con respecto al intestino delgado (Tabla 11), esto ratifica a lo reportado por Lu et al.⁽³⁸⁾, que la microbiota en el intestino grueso está conformado por la familia Clostridiaceae en un 60%, mientras que *Lactobacillus* spp representan el 25% del total. En el tracto del intestino grueso se observó que el grupo con el 10% HSZ y 0.5% HO tuvo mayor población ($p<0.01$) de *Lactobacillus* spp en los segmentos tanto del ciego como el colon en comparación con los demás grupos

Tabla 8. *Lactobacillus* spp (10^5 UFC/gr) en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano en el día 42.

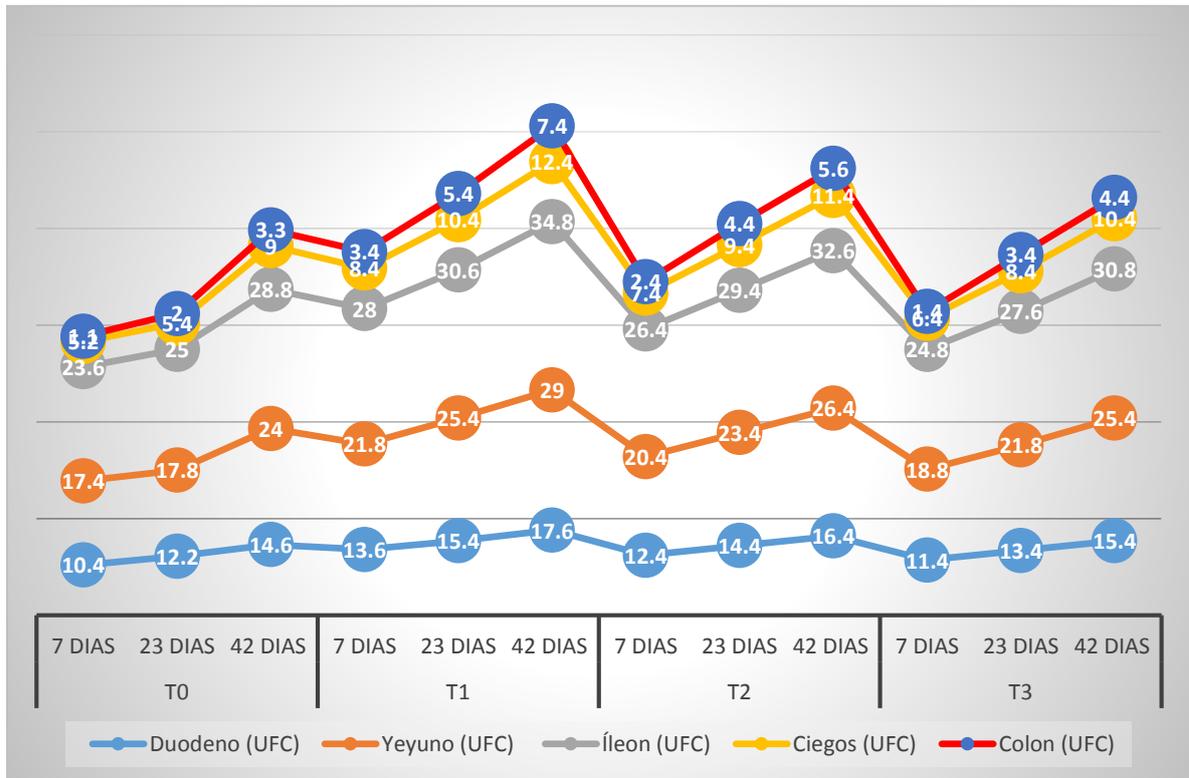
Tracto Gastrointestinal	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)			
	0% HSZ y 0% HO	10% HSZ y 0.5% HO	10% HSZ y 1% HO	10% HSZ
Duodeno	14.60±0.55 ^d	17.60±0.55 ^a	16.40±0.55 ^b	15.40±0.55 ^c
Yeyuno	24.00±0.71 ^d	29.00±1.00 ^a	26.40±0.55 ^b	25.40±0.55 ^c
Ileon	28.80±0.84 ^d	34.80±0.84 ^a	32.60±0.55 ^b	30.80±0.84 ^c
Ciegos	9.00±0.71 ^d	12.40±0.55 ^a	11.40±0.55 ^b	10.40±0.55 ^c
Colon	3.30±0.45 ^d	7.40±0.55 ^a	5.60±0.55 ^b	4.40±0.55 ^c

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a $p<0.01$

Fuente: Elaboración propia.

Al término de la fase de acabado, día 42, se observó el mismo comportamiento con respecto a los 22 días, es decir hubo un incremento ($p<0.01$) en la población de *Lactobacillus* spp. En el intestino delgado con respecto al intestino grueso, siendo este último en las porciones de ciego y colon que denoto un aumento ($p<0.01$) en el grupo de pollos alimentados con el 10% HSZ y 0.5% H.O en su dieta (Tabla 12), demostrando de esta manera la importancia en el incremento de bacterias benéficas como el *Lactobacillus* spp. Importante en el comportamiento productivo y reforzando la inmunidad de los animales inhibiendo ciertos patógenos oportunistas que forman parte de la microbiota intestinal, ratificando lo dicho polos autores mencionados anteriormente.

Figura 6. *Lactobacillus* spp (10^5 UFC) en pollos Cobb 500, alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)



En la figura N° 6, se muestra que en el intestino delgado (duodeno, yeyuno, ileon) y en el inestino grueso (ciegos y colón) hubo un aumento significativo ($P < 0,01$) de *Lactobacillus spp* en el grupo de pollos Cobb 500 alimentados con Harina de zapallo 10% y Harina de oregano 0,5% en todas las fases productivas a los 7 días, 23 días y 42 días siendo esta en donde hubo más aumento con respecto a los demas grupos experimentales: T0 (Harina de zapallo 0% Y Harina de orégano 0%), T2 (Harina de zapallo 10% Y Harina de oregano 1%) y T3 (Harina de zapallo 10% y Harina de orégano 0%)

Figura 7. *Lactobacillus* spp (10^5 UFC) y *Escherichia coli* (10^4 UFC) en el intestino delgado de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO).

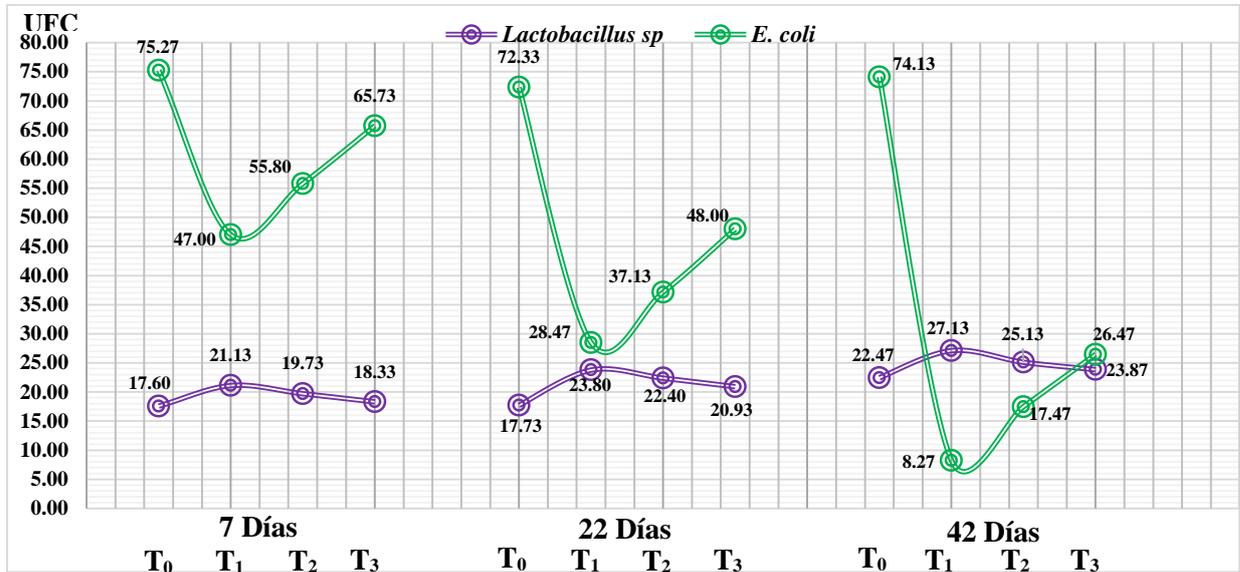
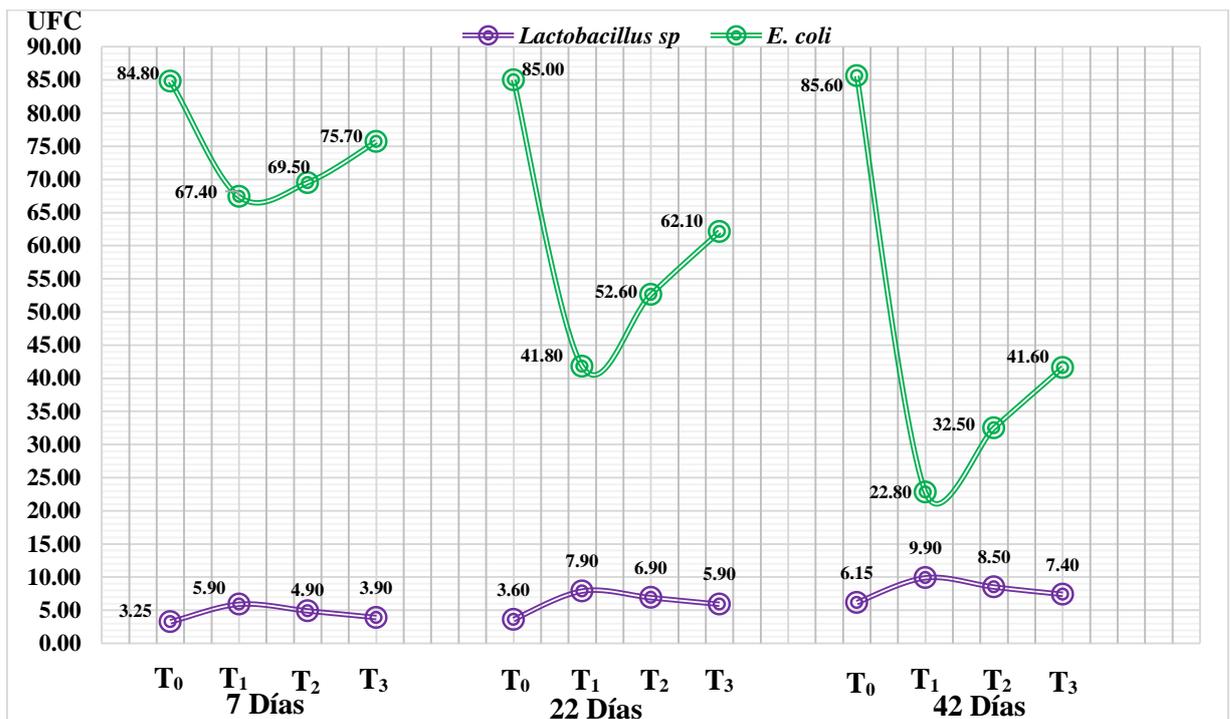


Figura 8. *Lactobacillus* spp (10^5 UFC) y *Escherichia coli* (10^4 UFC) en el intestino grueso de pollos alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO).



Los pollos alimentados con diferentes niveles de HSZ y HO, se observa un antagonismo entre *Lactobacillus* spp y *Escherichia coli*, es decir que al aumentar la población de *Lactobacillus* spp disminuye la *Escherichia coli* tanto en el intestino delgado (Figura 7) como en el grueso (Figura 8), notándose que los pollos al recibir el 10% HSZ y 0.5% HO en su dieta logro la mayor población ($p<0.01$) de *Lactobacillus* spp y la menor población ($p<0.01$) de *Escherichia coli* ($p<0.01$), esto se debe a que las bacterias ácido lácticas presentan actividad antagónica o antimicrobiana produciendo ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno; además otro factor importante llamada bacteriocinas el cual se le debe el poder antibacteriano⁽⁷⁴⁾; estas exhiben una actividad inhibitoria frente a diferentes especies alterantes o patógenas⁽⁷⁶⁾, estudios de otras investigaciones respaldan como por ejemplo lo reportado por Ruiz et al.⁽⁶⁸⁾, observando un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7, de igual manera Vasek et al.,⁽⁷³⁾ observó disminución de la población de microorganismos siendo una de las bacteriocinas más estudiadas y la responsable del poder antibacteriano de las bacterias ácido lácticas es la “Nisina” con efectos positivos en la eliminación de microorganismos patógenos importantes para la avicultura; por lo que queda demostrado la eficacia de la inclusión de HSZ al 10% y HO al 0.5% en la dieta de las aves.

V. CONCLUSIONES

La población de *Escherichia coli* disminuyó ($p < 0.01$) en el grupo de pollos alimentados con una dieta que incluyó el 10% de Harina de zapallo y el 0.5% de Harina de orégano en la fase de inicio, crecimiento y acabado.

La población de *Lactobacillus* spp aumentó ($p < 0.01$) en el grupo de pollos alimentados con una dieta que incluyó el 10% de Harina de zapallo y el 0.5% de Harina de orégano en las fases de inicio, crecimiento y acabado.

Al aumentar la población de *Lactobacillus* spp tuvo un efecto antagónico con respecto a la población microbiana de *Escherichia coli*, gracias a la inclusión en la dieta de las aves del 10% de Harina de zapallo y el 0.5% de Harina de orégano.

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda utilizar masivamente la inclusión de harina de zapallo 10% y orégano 0.5% en la dieta de pollos para la prevención de enfermedades.
- ✓ Incluir en los sistemas de producción avícola en las dietas la harina de zapallo 10% y orégano 0.5% para incrementar la población de *Lactobacillus* spp y disminuir la de *Escherichia coli*, como medida de prevención de patógenos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Agostinho TSP, Calixto LFL, Gomes AV da C, Togashi CK, Curvello FA, de Lima MF. Desenvolvimento de órgãos do trato gastrintestinal e desempenho de frangos de corte arraçoados na fase pré-alojamento. *Rev Bras Saude e Prod Anim*. 2012;13(4):1143–55.
3. Morales R, Brufau J. Immune-modulatory effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall in broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Br Poult Sci*. 2013;54(2):247–51.
4. Castanon JIR. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult Sci* [Internet]. 2007;86(11):2466–71. Available from: <https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.3382/ps.2007-00249>
5. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 2001;91(3):453–62.
6. Oosterhaven K, Poolman B, Smid EJ. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Ind Crops Prod*. 1995;4(1):23–31.
7. Shiva C, Bernal S, Sauvain M, Caldas J, Kalinowski J, Falcón N, et al. Evaluación del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y extracto deshidratado de jengibre (*Zingiber officinale*) como potenciales promotores de crecimiento en pollos de engorde. *Rev Investig Vet del Peru*. 2012;23(2):160–70.
8. Ravishankar K, Kiranmayi GVN, Reddy GVA, Sowjanya VVL, Sainadh VB, Durga VGL, et al. in-Vitro Antibacterial Activity of *Cucurbita Maxima* Seed Extract. *Int J Res Pharm Chem*. 2012;2(1):86–91.
9. Di Stasi LC, Hiruma CA. *Plantas Mediciniais na Amazonia e na Mata Atlantica*. Segunda Ed. Sao Paulo; 2002. 178 p.
10. 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>
11. Martínez Y, Valdivié M, Leyva E. Potencialidades de la semilla de calabaza como alimento para monogástricos. *Rev ACPA*. 2008;4(20):73–8.
12. Simopoulos AP. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002;21:495–505.
13. AP. S. he importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(8):365–79.
14. Lopez EA. Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*. [Internet]. Universidad Técnica de Ambato; 2018. Available from: [http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis 130 Medicina Veterinaria y Zootecnia -CD 568.pdf](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis%20130%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568.pdf)
15. Roofchaee A, Ebrahimzadeh MA, Akbari MR. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens Ileal Microbial Population and Serum Enzyme Activity Affected By Dietary Source of NonStarch View proj. *African J Biotechnol* [Internet]. 2011;10(32):6177–83. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJB>
16. Kirkpinar F, Ünlü HB, Özdemir G. Effects of oregano and garlic essential oils on

- performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. Vol. 137, *Livestock Science*. 2011. p. 219–25.
17. Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2007;134(3–4):304–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840106002562>
 18. Del Castillo A, Molinares P, Campo M, Bettin A. Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de Cucurbita moschata Duchesne (Ahuyama). *Rev Cuba Plantas Med* [Internet]. 2017;22(1):1–13. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L617970949%0Ahttps://mskcc-primo.hosted.exlibrisgroup.com/openurl/01MSKCC/MSKCC?sid=EMBASE&sid=EMBAS E&issn=10284796&id=doi:&atitle=Antibacterial+activity+of+total+extract+from+leaves>
 19. El Zawane K, Qamar A, Abul MH, Zuvaira MS, Ahmad KC. Studies on bactericidal efficacy of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) peel. *J Coast Life Med*. 2014;2(2):146–53.
 20. Rinttilä T, Apajalahti J. Intestinal microbiota and metabolites Implications for broiler chicken health and performance. *J Appl Poult Res*. 2013;22(3):647–58.
 21. Pan D, Yu Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 2014;5(1):37–41.
 22. 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, Dummerstorf,; 1994. p. 231–240.
 23. Korver DR. Overview of the immune dynamics of the digestive system. *J Appl Poult Res*. 2006;15:123.
 24. 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.
 25. Zoetendal EG, Cheng B, Koike S, Mackie RI. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2004;5:31–47.
 26. Mackie RI. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: Diversity and evolution. *Integr Comp Biol*. 2002;42:319–26.
 27. 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.
 28. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:4985–96.
 29. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*. 2011;149:88–105.
 30. Amit E, Sklan D, Uni Z. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poult Sci*. 2004;83:1093–1098.
 31. 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.
 32. Allen HK, Stanton TB. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:297–315.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Salanitro JP, Fairchild IG, Zgornicki YD. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl Microbiol*. 1974;27(4):678–687.

37. 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.
38. 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.
39. Cao GT, Zeng XF, Chen AG, Zhou L, Zhang L, Xiao YP, et al. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult Sci.* 2013;92(11):2949–55.
40. Jay J. Indicadores de la calidad e inocuidad microbianas de los alimentos. In: *Microbiología moderna de los alimentos*. 4th edicio. Zaragoza (España): Acribia, S.A.; 2002. p. 363–78.
41. 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.
42. Fuller R, Perdígón G. *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*. Iowa, USA.: Black well Publishing; 2003. p. 36.
43. 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.
44. 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.
45. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci.* 2005;84:634–43.
46. 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.
47. Niewold TA. The Nonantibiotic antiinflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci.* 2007;86:605–9.
48. Marchant PI. Detección de *Escherichia coli* patógena en mamíferos y aves acuáticas silvestres en cautiverio [Internet]. Universidad de Chile; 2013. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131637/Deteccion-de-Escherichia-coli-patogena-en-mamiferos-y-aves-acuaticas-silvestres-en-cautiverio.pdf?sequence=1>
49. 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.
50. Lee M, Nolan L. Colibacillosis. In: Dufour L et al., 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.
51. Baltzley T, Rehberg T. Characterization of avian pathogenic *E. coli* in a layer production facility. *Wisconsin.*; 2006.
52. Todar K. Pathogenic *E. coli* [Internet]. textbookofbacteriology.net. 2008 [cited 2019 Apr 12]. Available from: <http://www.textbookofbacteriology.net/>
53. Margall N, Domínguez A, Prats G, Salleras L. *Escherichia coli* Enterohemorrágico. *Rev Española Salud Pública.* 1997;71:437–443.
54. 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.
55. Naylor S, Gally D, Low J. Enterohemorrhagic *E. coli* in Veterinary Medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005;295:419–41.
56. O'sullivan J, Bolton D, Duffy D, Baylis C, Tozzoli R, Wasteson Y, et al. Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic *Escherichia coli*. *Asthan Food Research Centre*. Asthan Food Res Centre Dublín, Irlanda. 2007;34.
57. Wasteson Y. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Vet Scand Suppl.* 2001;95:79–64.
58. Chaudury R, Henderson I. The Evolution of *Escherichia coli* Phylogeny. *Infect Genet Evol.* 2012;12:214–226.

59. Dibner JJ, Richards JD. *The Digestive System: Challenges and Opportunities*. Missouri USA: St. Charles; 2004.
60. Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect.* 2002;4:309–17.
61. Apajalahti J, Bedford MR. Improve bird performance by feeding its microflora. *Worlds Poult Sci J.* 1999;15:20–3.
62. 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.
63. 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.
64. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989;66(5):365–78.
65. Huda-Faujan N, Abdulmir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, et al. 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.
66. Hamid THTA, Ezureen E. Isolation of lactic acid bacteria from malaysian non-broiler chicken (*Gallus gallus*) intestine with potential probiotic for broiler feeding. *IIUM Eng J.* 2011;12(4):133–9.
67. Tannock G, Fuller R, Pedersen K. *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Env Microbiol.* 1990;56(13):1310–1316.
68. 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>
69. Roldán ML, Otero JL, Villarreal F, Baroni MR, Carrasco MS, Álvarez C, et al. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2011;37:37–41.
70. 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.
71. Gómez S, Guzmán D. Efecto antagónico de BAL autóctonas del Huila sobre *Salmonella enteritidis* aviar. Pontificia universidad javeriana, Bogota; 1999.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. Cabeza E. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Universidad de Pamplona; 2005.
77. Ruiz A, Williams SK, Dyeri N, Hinton AJ, Rodrick GE. Nisin affects the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey ham stored at four degrees celsius for sixty-three days. *Poult Sci.* 2010;89(2):353–358.
78. Van E, Goris J, Cleenwerck I, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Van I, et al. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella Enteritidis*. *J Appl Bacteriol.* 2007;102(4):1095–1096.
79. 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.
80. 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
 81. 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.
 82. Ghosh S, Gardner JM, Smoyer CJ, Friederichs JM, Unruh JR, Slaughter BD, et al. 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>
 83. 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.
 84. Apajalahti J. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. *J Appl Poult Res.* 2005;14(2):444–53.
 85. Wei S, Morrison M, Yu Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult Sci.* 2013;92(3):671–83.
 86. 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.
 87. Gast RK, Holt PS. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella enteritidis* at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poult Sci.* 2000;79:559–63.
 88. Cook N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J Microbiol Methods.* 2003;53:165–174.
 89. Okamura M, Tachizaki H, Kubo T, Kikuchi S, Suzuki A, Takehara K, et al. 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.
 90. Erickson MD, M. Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry _ *Poultry Science _ Oxford Academic.* 2018;(April):960–73.
 91. Methner U, Al-Shabibi S, Meyer H. Infection Model for Hatching Chicks Infected with *Salmonella enteritidis*. *J Vet Med Ser B.* 1995;42(1–10):471–80.
 92. Cox NA. Effect of Fructooligosaccharide on *Salmonella* Colonization of the Chicken Intestine. 1992;(November 2015):2433–8.
 93. Yin Y, Lei F, Zhu L, Li S, Wu Z, Zhang R, et al. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME J.* 2010;4(3):367–76.
 94. Wagner RD. No Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50:1061–1071.
 95. 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.
 96. Nakphaichit M, Thanomwongwattana S, Phraephaisarn C, Sakamoto N, Keawsompong S, Nakayama J, et al. 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.
 97. Gong J, Yu H, Liu T, Gill JJ, Chambers JR, Wheatcro R, et al. 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.
 98. 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.
99. Qu A, Brulc JM, Wilson MK, Law BF, Theoret JR, Joens LA, et al. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. PLoS One. 2008;3(8).
 100. M.P. Castañeda, I E. M. Hirschler and ARSD. Skin pigmentation evaluation in broilers fed naturally and synthetic pigments. EggMeat Symp. 2005;308.
 101. Benítez-García I, Vanegas-Espinoza PE, Meléndez-Martínez AJ, Heredia FJ, Paredes-López O, Del Villar-Martínez AA. Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. Electron J Biotechnol [Internet]. 2014;17(3):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.01.004>
 102. Ortiz 2008 JCRS_18242446.pdf.
 103. Jacobo N, Maróstica MR, Zazueta-Morales J de J, Gallegos-Infante JA. Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca. A Review. Food Res Int [Internet]. 2011;44(9):2587–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.039>
 104. Tosse DET, Cabrera FAV, García DB. Evaluación de familias de zapallo (*Cucurbita moschata* Duch.) seleccionadas por mayor contenido de materia seca en el fruto y otras características agronómicas. Acta Agronómica [Internet]. 2010;59(1):65–72. Available from: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/14033/14939
 105. Saeleaw M, Schleining G. Composition , Physicochemical and Morphological Characterization of Pumpkin Flour. 11th Int Congr Eng Food - “Food Process Eng a Chang World.” 2011;5.
 106. Restrepo MPV, Grisales SO, Cabrera FAV, García DB. Variabilidad en frutos y semillas de *Cucurbita moschata* Duch. y *Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia* L.H. Bailey Merrick & D.M. Bates. Acta Agron. 2013;63(3).
 107. Manal KA. Effect of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo* L.) Diets on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH): Chemical and Morphometric Evaluation in Rats. World J Chem. 2006;1(1):33–40.
 108. González Chavarrea DM, Yáñez Andrade YM, Villacrés M. Diseño y Construcción de un Extractor Sólido-Líquido para la Obtención de Aceite de Semillas de Sambo y Zapallo. Fac Ciencias [Internet]. 2012;Bachelor:110. Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1978>
 109. Mi YK, Eaun JK, Young-Nam K, Chagsun C, Bog-Hieu L. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. Nutr Res Pract. 2012;6(1):21–7.
 110. Banchio E, Bogino PC, Zygadlo J, Giordano W. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochem Syst Ecol [Internet]. 2008;36(10):766–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2008.08.006>
 111. Lavabre MF. Aromatherapy workbook. Rochester: Healing Arts Pres.; 1990.
 112. Lawrence BM. The botanical and chemical aspects of oregano. Perfum Flavor. 1984;9:41–52.
 113. Oliver GW. The world market of oregano. In: Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. Valenzano, Bari, Italy.; 1996.
 114. Leto C, Salomone A. Bio-agronomical behaviour in Sicilian *Origanum* ecotypes. In: Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. Bari, Italy: Centre international de hautes études agronomiques méditerranéennes; 1996.
 115. Silva R, Dunford N. Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J Essent Oil Res. 2005;17(6):zquez.
 116. Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris DJ, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. Br Poult Sci. 2002;43(2):223–30.
 117. Uribe CJ. The essential oil of *Lippia graveolens* H.B. K. from Jalisco México. J Essent Oil Res. 1992;4:647–9.

118. Vernin G, Lageot C, Gaydou E, Parkanyi C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. *J Flavour Fragr.* 2001;16:219–26.
119. Nitsas FA. Pharmaceutical composition containing herbal-based active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. United States Pat. 2000;6:838.
120. Govindarajan M, Rajeswary M, Hoti SL, Benelli G. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Res Vet Sci [Internet]*. 2016;104:77–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.11.011>
121. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *J Agric Food Chem [Internet]*. 1996;44(5):1202–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf950540t%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf950540t%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/jf950540t>
122. Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *J Food Prot [Internet]*. 2001;64(7):1019–24. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-64.7.1019>
123. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem.* 2001;49(9):4168–70.
124. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol.* 2000;174(4):233–8.
125. 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>
126. Climate-Data.org. Clima Túcume [Internet]. 2019 [cited 2017 Nov 20]. Available from: <https://es.climate-data.org/location/49804/>
127. Googlemaps. Mapa satelital del distrito de Túcume [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 12]. Available from: <https://www.google.com.pe/maps/place/Túcume+Viejo,+Túcume+14120/@-6.5127094,-79.8444971,2969m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x904c90c463047493:0x8943f2f644b5eee8!8m2!3d-6.5055035!4d-79.8456987>
128. Perusquía MT, Paasch L. *Necropsia en aves*. Mexico D.F.: Editorial Trillas. S.A.; 1985.
129. Guerra A, Agurto T. *Microbiología Básica*. Universidad Ricardo Palma; 2004.
130. Gry J, Soborg I, Christer AH. *Cucurbitacins in plant food*. Copenhagen; 2006.
131. Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Sangwan, N.S., A.H.A. Farooqi, F. Shabih and R.S. Sangwan. *Plant Growth Regul.* 2001;34:3–21.
132. Muñoz, Ben Arfa A, Combes S, Gontard N, Chalier P. Y Hidrodestilación Asistida Por La Radiación De Microondas. *Lett Appl Microbiol.* 2007;43(2):149–54.
133. Salanitro 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.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Instalación del galpón experimental



Anexo 2. Alimentación a los pollos de nuestro galpón experimental.



Anexo 3. Recolección de semilla de zapallo en el mercado de Moshoqueque.



Anexo 4. Secado de semillas de zapallo



Anexo 5. Secado de orégano.



Anexo 6. Análisis bromatológico de harina de semilla de zapallo y orégano.

Indicadores (g/100g)	Zapallo	Orégano
Humedad	7.87±0.01	12.54±0.04
Ceniza	4.53±0.12	10.08±0.07
Grasa	20.46±0.41	1.01±0.06
Proteína Bruta	23.29±0.00	15.97±0.23
Fibra	32.00±0.14	12.98±0.21
Carbohidratos totales	43.86±0.27	60.28±0.20

Anexo 7. Composición, aporte y costo de las dieta en la fase de Inicio de pollos Cobb 500

Ingredientes	Niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y			
	Harina de Orégano (HO)			
	0%HSZ y 0% HO	10%HSZ y 0.5% HO	10%HSZ y 1% HO	10%HSZ
Harina de semilla de Orégano	0	0.5	1	0
Harina de Maíz	58.3	53.37	31.25	53.51
Harina de soya	36.8	33.1	39.15	32.5
Harina de semilla de zapallo	0	10	10	10
Aceite de soya	1.7	0.3	0.3	0.5
Fosfato di cálcico	1	1.2	1.76	1.1
Carbonato de Calcio	1.55	0.1	1.2	0.01
Sal	0.13	0.25	0.1	0.2
Metionina 99%	0.21	0.17	0.24	0.17
Lisina 99%	0.01	0.01	0	0.01
Premezcla	0.3	1	1	1
Costo (S/. Kg)	1.34	1.40	1.43	1.47
Aporte Nutricional (%)				
EM (Kcal/g)	3096.36	3097.01	3099.85	3097.88
Proteína Bruta (%)	22.92	23.11	22.91	23.07
Calcio (%)	0.99	1.14	1.09	1.13
Fosforo disponible (%)	0.39	0.45	0.44	0.45
Fibra Bruta (%)	5.00	5.50	5.55	5.44
Lisina	1.25	1.31	1.29	1.31
Metionina	0.59	0.58	0.57	0.58
Extracto Etéreo	8.30	8.68	8.81	8.70

Anexo 8. Composición, aporte y costo de las dieta en la fase de Crecimiento de pollos Cobb 500

Ingredientes	Niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano(HO)			
	0%HSZ y 0% HO	10%HSZ y 0.5% HO	10%HSZ y 1% HO	10%HSZ
Harina de semilla de Orégano	0	0.5	1	0
Harina de Maíz	67	60.63	60.37	60.27
Harina de soya	29	26	26	27
Harina de semilla de zapallo	0	10	10	10
Aceite de soya	0.61	0	0	0
Fosfato di cálcico	0.67	1.2	1.1	1.2
Carbonato de Calcio	1.6	0.1	0.01	0.1
Sal	0.1	0.25	0.2	0.25
Metionina 99%	0.22	0.22	0.22	0.17
Lisina 99%	0.1	0.1	0.1	0.01
Premezcla	0.7	1	1	1
Costo (S/. Kg)	1.35	1.37	1.38	1.39
Aporte Nutricional(%)				
EM (Kcal/g)	3130.85	3136.28	3141.02	3129.58
Proteína Bruta (%)	20.40	20.40	20.45	20.42
Calcio (%)	0.90	1.12	1.07	1.12
Fosforo disponible (%)	0.35	0.46	0.44	0.46
Fibra Bruta (%)	5.10	5.43	5.49	5.39
Lisina	1.11	1.16	1.16	1.14
Metionina	0.56	0.59	0.59	0.55
Extracto Etéreo	7.40	7.73	7.73	7.85

Anexo 9. Composición, aporte y costo de las dieta en la fase de Acabado de pollos Cobb

500

Ingredientes	Niveles de harina de semilla de zapallo (HSZ) y Harina de Orégano(HO)			
	0%HSZ y 0% HO	10%HSZ y 0.5% HO	10%HSZ y 1% HO	10%HSZ
Harina de semilla de Orégano	0	0.5	1	0
Harina de Maíz	72	67.33	66.57	68.07
Harina de soya	24	20	20.5	20
Harina de semilla de zapallo	0	10	10	10
Aceite de soya	0.5	0	0	0
Fosfato di cálcico	0.6	0.5	0.4	0.4
Carbonato de Calcio	1.4	0.1	0.01	0.1
Sal	0.2	0.25	0.2	0.25
Metionina 99%	0.2	0.22	0.22	0.17
Lisina 99%	0.1	0.1	0.1	0.01
Poultry Grow 250	1	1	1	1
Costo (S/. Kg)	1.37	1.31	1.34	1.32
Aporte (%)				
EM (Kcal/g)	3209.05	3207.38	3208.12	3211.98
Proteína Bruta (%)	18.05	18.12	18.17	18.06
Calcio (%)	0.79	0.92	0.87	0.88
Fosforo disponible (%)	0.34	0.36	0.35	0.35
Fibra Bruta (%)	5.15	5.39	5.45	5.34
Lisina	0.97	0.99	1.01	0.95
Metionina	0.51	0.56	0.56	0.51
Extracto Etéreo	7.00	7.21	7.25	7.23

Anexo 10. Necropsia de las aves de estudio



Anexo 11. Separación de los segmentos intestinales



Anexo 12. Esterilización del material para la preparación de los medios de cultivo bacteriano



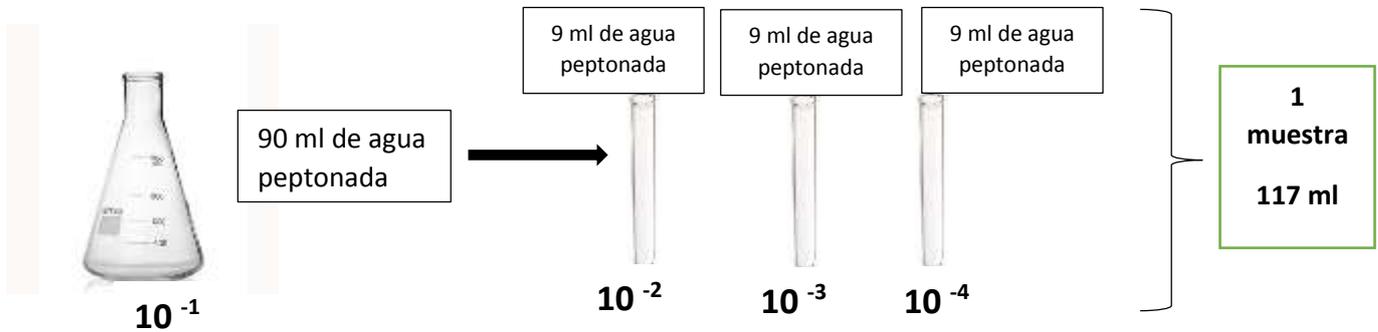
Anexo 13. Peso de las porciones del tractogastorintestinal de los pollos cobb 500 (duodeno, yeyuno, ileon, ciegos y colon)



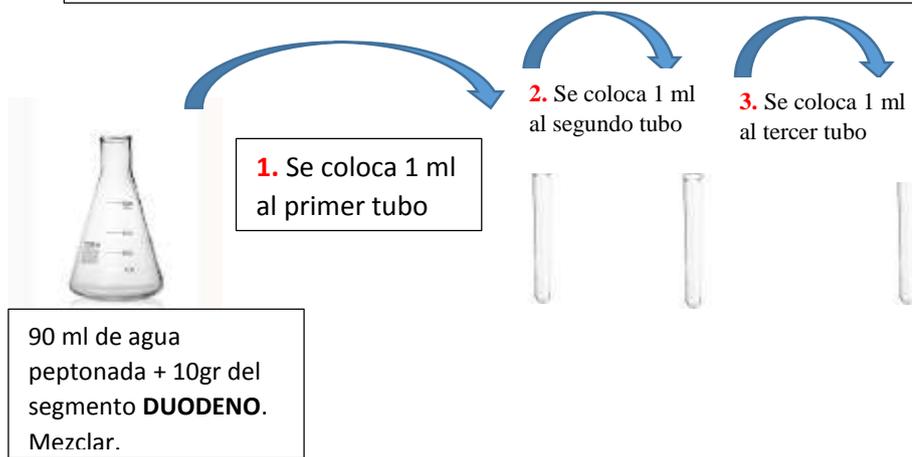
Anexo 14. Técnica utilizada en el laboratorio de Microbiología:

➤ PREPARACION DEL AGUA PEPTONADA 0.1%:

Se pesa 0.1 gr de agua peptona y luego se coloca en 100 ml de agua destilada. Mezclar bien.



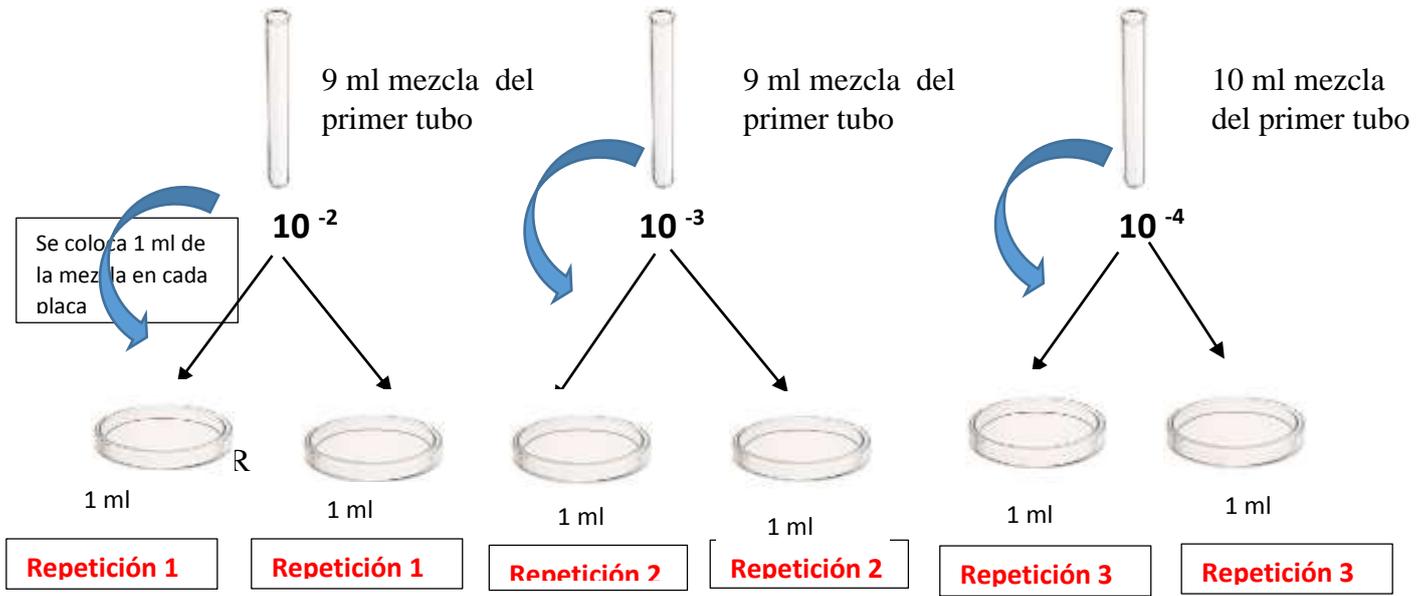
Pollo #1: 5 segmentos: duodeno, yeyuno, ciego derecho, ciego izquierdo y colon



Anexo 15. Preparación del agar peptona



Escherichia coli



A. Agar TBX cromogénico
B. Agar peptona



A. Agua destilada (deshionizada)



B. Preparación del Agar TBX cromogénico



A. Técnica de sembrado a profundidad de Agar cromogénico TBX en placas Petri.

❖ Agar TBX Cromogénico (**técnica sembrado a profundidad**) en placas.



Anexo 16. Primeras diluciones 10^{-1}



Anexo 17. Técnica de cada dilución 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} para luego realizar el sembrado



Anexo 18. Técnica de sembrado en placas Petri con agar cromogénico



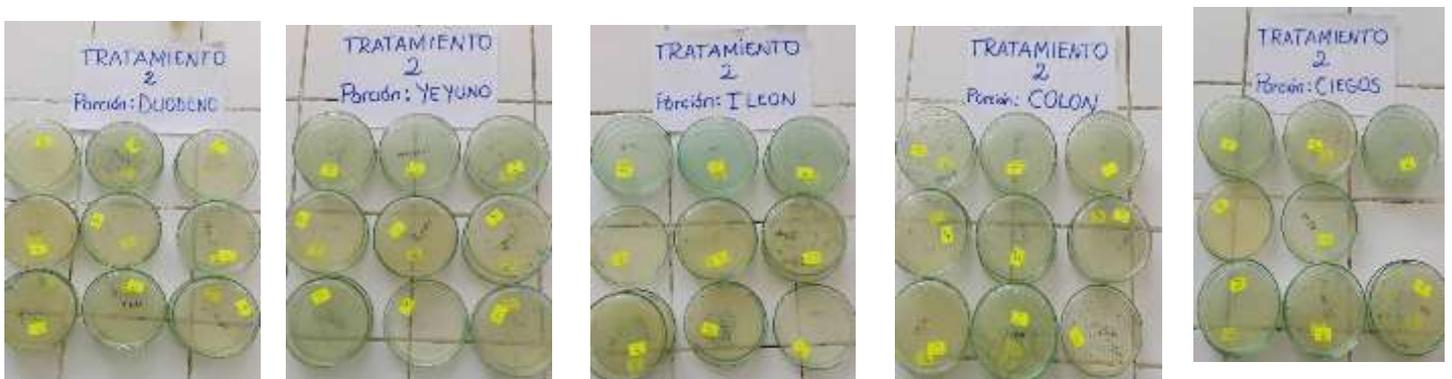
Anexo 19. Agar cromogénico diluido.



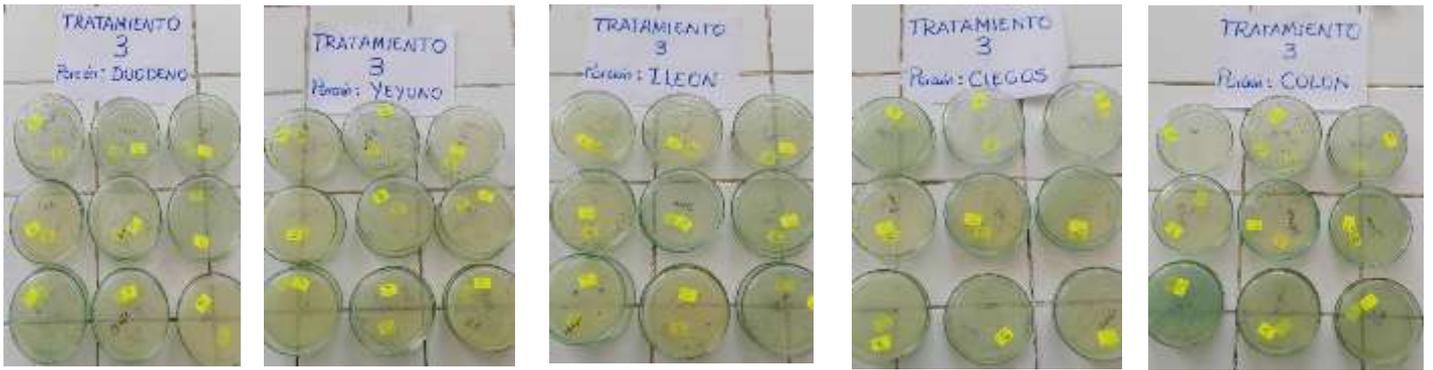
Anexo 20. Resultados de *Escherichia Coli*.



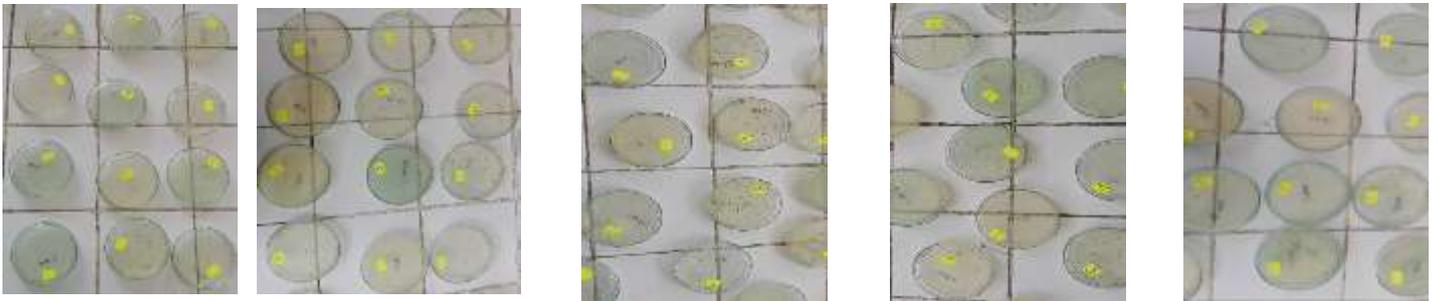
Resultados del crecimiento de *Escherichia coli* en Agar TBX cromogénico, en las 5 porciones del tracto gastrointestinal del Tratamiento 0 (control)



Resultados del crecimiento de *Escherichia coli* en Agar TBX cromogénico, en las 5 porciones del tracto gastrointestinal del Tratamiento 1: Harina de zapallo 10% y harina de orégano 0.5%



Resultados del crecimiento de *Escherichia coli* en Agar TBX cromogénico, en las 5 porciones del tracto gastrointestinal del Tratamiento 2 (10% Harina Zapallo y 1% Harina Orégano)

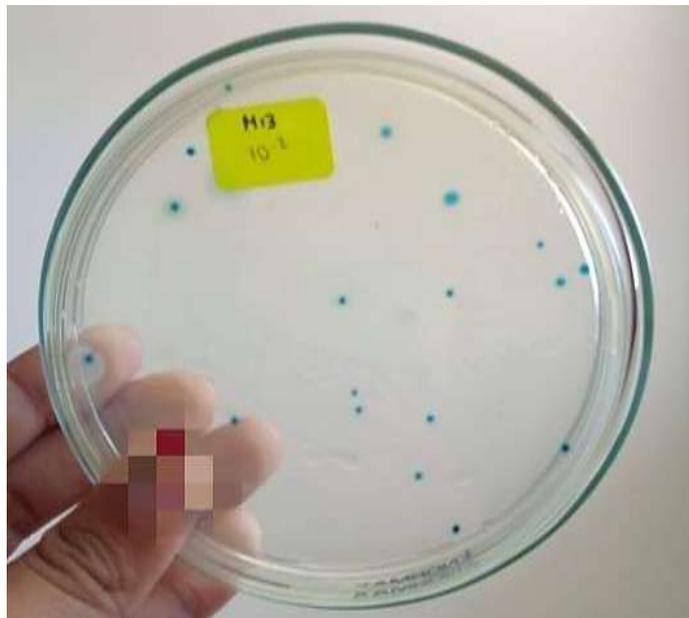


Resultados del crecimiento de *Escherichia coli* en Agar TBX cromogénico, en las 5 porciones del tracto gastrointestinal del Tratamiento 3 (10% Harina Zapallo y 0% Harina Orégano)

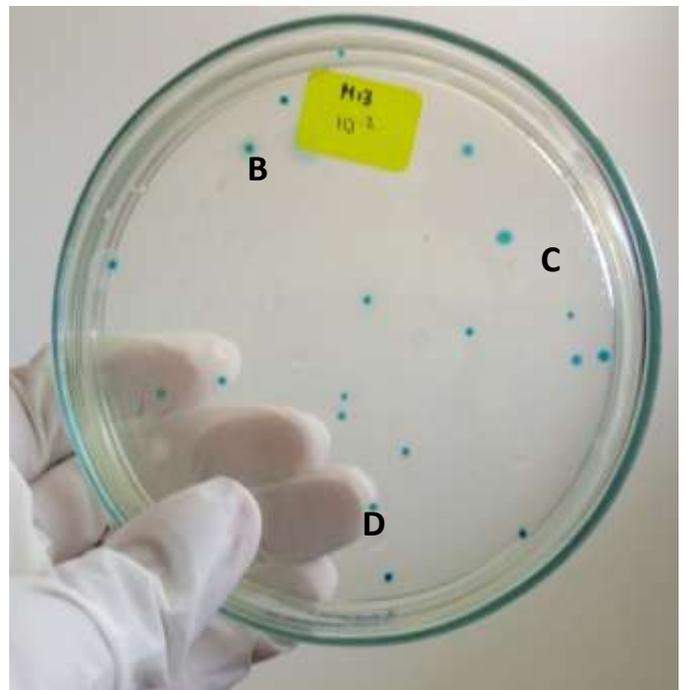
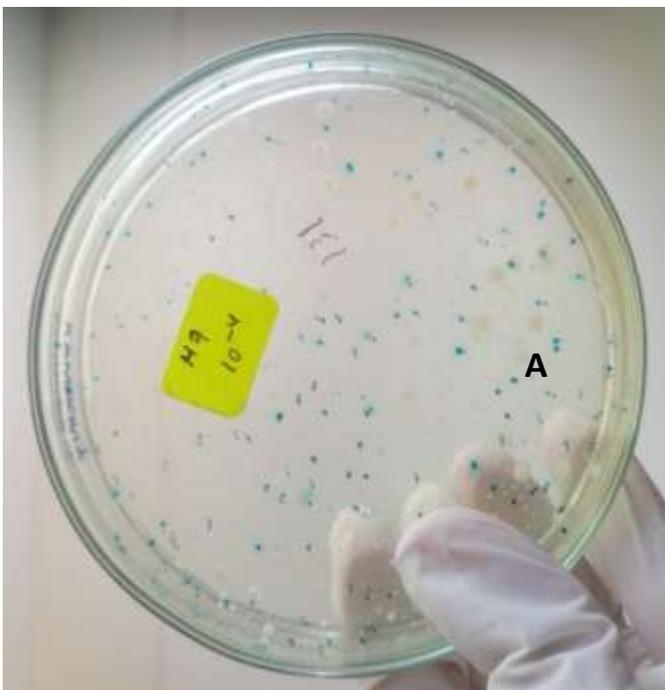
Incubación de *E. coli* en estufa a 45°C por 24 horas



Colonias de *Escherichia coli* en agar cromogénico



Colonias de *Escherichia coli*, color azul violeta.



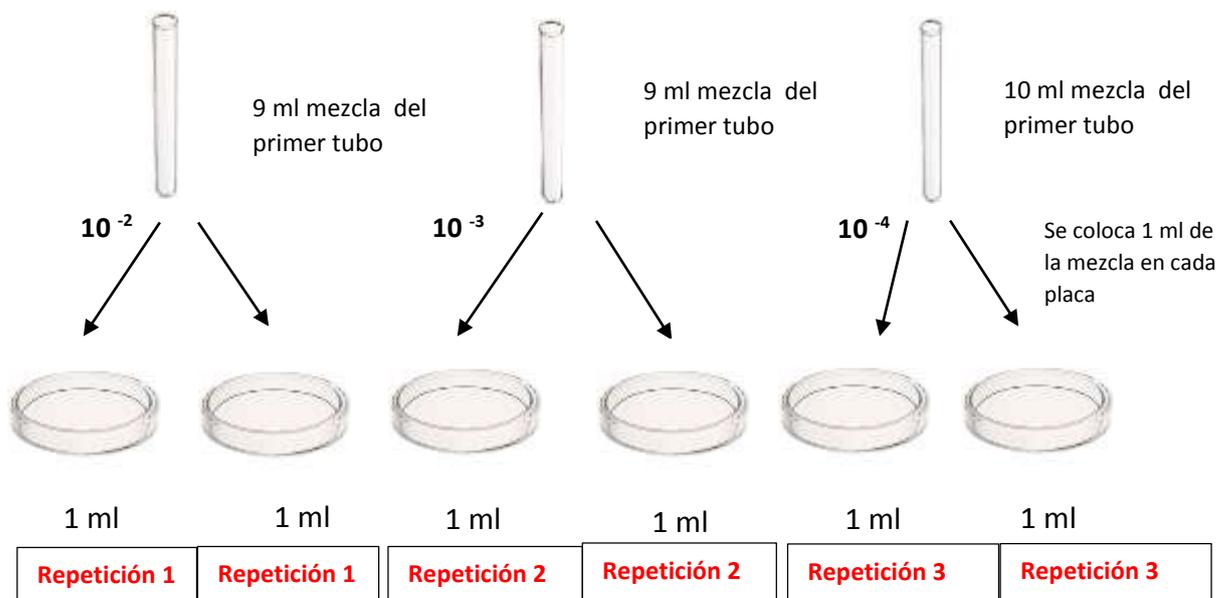
A,B,C,D Colonias de *Escherichia coli* color azul violeta

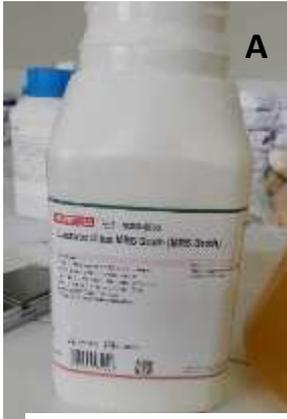
Anexo 21. Recuento de colonias de *E. coli* del contenido intestinal de pollos Coob.500 en agar cromogénico TBX.



Lactobacillus spp:

De las diluciones en los tubos de ensayo, luego se colocará 1 ml de cada mezcla con ayuda de la pipeta en las placas: **Ejm:** Segmento **duodeno** del pollo.





A



B

- A. Agar Man Rogosa MRS
- B. Agua destilada (deshionizada)



A

- A. Preparación del Agar Man Rogosa MRS



A

- A. Agar Man Rogosa MRS preparado.



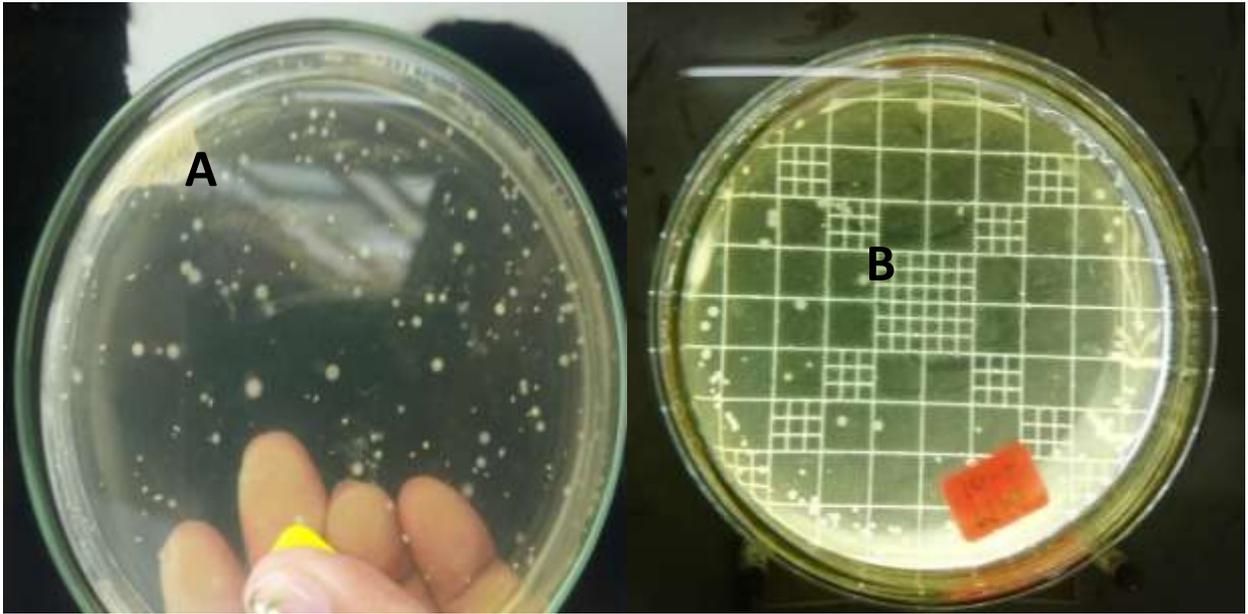
A

- A. Técnica de sembrado a profundidad en Agar Man Rogosa TBX en placa Petri.

Anexo 22. Recuento de colonias de *Lactobacillus spp* del contenido intestinal de pollos Coob.500 en agar Man Rogosa (M.R.S.)



Anexo 23. Lector de colonias

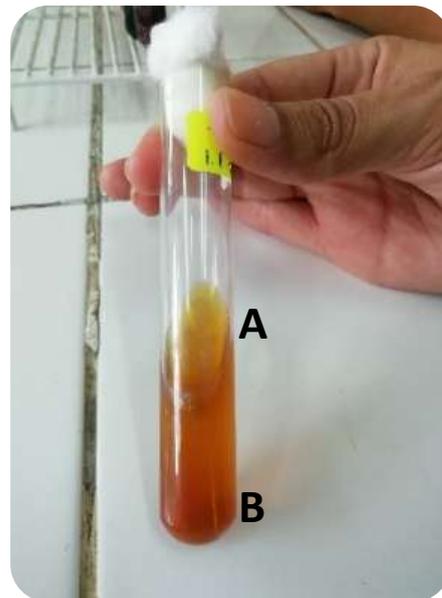
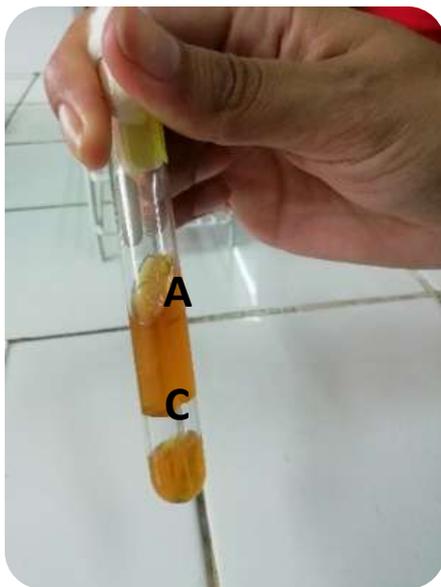


A. Colonias de *Lactobacillus spp* color blanquecinas con apariencia mucoides o cremosa

B. Colonias de *Lactobacillus spp* en el cuadrante del contador de colonias.

Anexo 24. Identificación de colonias *Escherichia coli*

➤ TSI (Triple Sugar Iron)

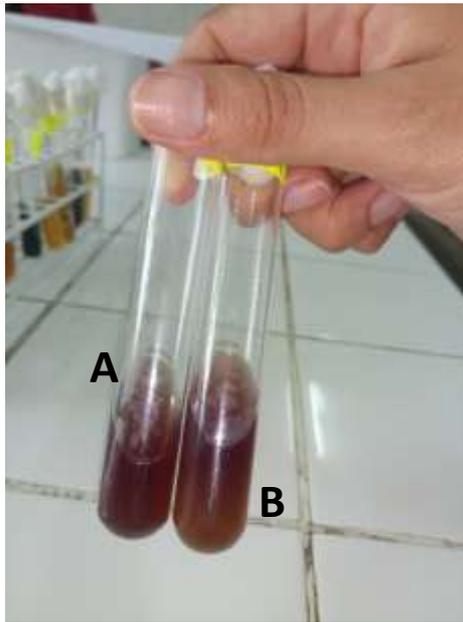


A. TSI positivo (Fondo: color amarillo)

B. TSI positivo (Pico: color amarillo)

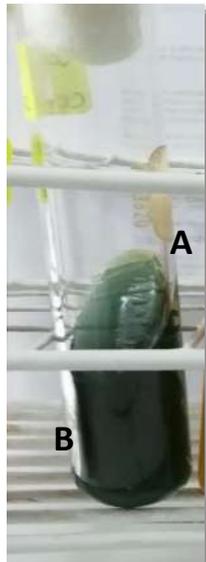
C. Presencia de gas.

➤ LIA (Agar Lisina Hierro)



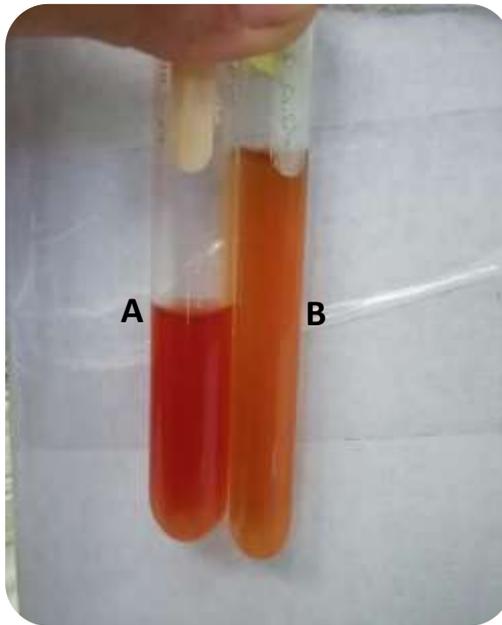
- A. LIA positivo (Fondo: color amarillo)
- B. LIA positivo (Pico: color purpura)

➤ Agar Citrato de Simmons



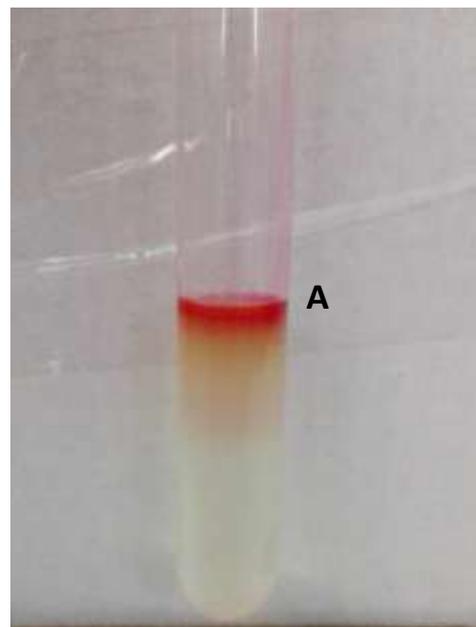
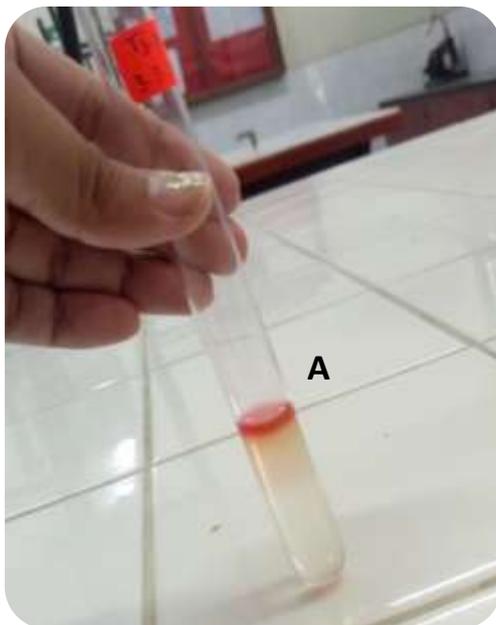
- A. Citrato Simons positivo (Fondo: color verde)
- A. Citrato Simons positivo (Pico: color verde)

➤ Caldo Glucosado



- A. Rojo de metileno positivo (color rojo)
- B. Vorges-Proskauer negativo (mantiene su color)

➤ Prueba del Indol



- A. Indol positivo (formación del anillo color rojo)



Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli*

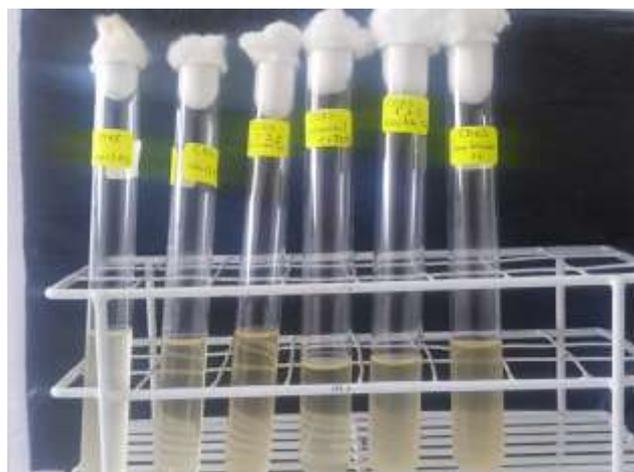
Anexo25. Identificación de colonias *Lactobacillus spp*



A. Antes del sembrado



B. pruebas bioquímicas para identificar *Lactobacillus spp.* Se observa turbidez en el medio.



ANEXO 26. *Escherichia coli* en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano

TGI	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)											
	0% HSZ y 0% HO			10% HSZ y 0.5% HO			10% HSZ y 1% HO			10% HSZ		
	7 Dias	23 Dias	42 Dias	7 Dias	23 Dias	42 Dias	7 Dias	23 Dias	42 Dias	7 Dias	23 Dias	42 Dias
Duodeno	71.60±1.14 ^a	73.20±1.92 ^a	73.80±3.11 ^a	44.60±3.05 ^d	25.20±3.49 ^d	5.60±2.88 ^d	53.20±2.28 ^c	34.00±3.08 ^c	15.00±2.91 ^c	66.40±2.41 ^b	44.60±2.30 ^b	25.00±3.00 ^b
Yeyuno	71.80±1.64 ^a	73.80±1.48 ^a	74.40±3.51 ^a	50.00±3.16 ^d	35.20±3.11 ^d	14.20±2.59 ^d	57.20±1.92 ^c	43.80±2.77 ^c	22.80±1.30 ^c	65.60±2.61 ^b	54.00±2.55 ^b	30.20±3.19 ^b
Íleon	73.60±2.07 ^a	75.40±1.67 ^a	77.60±2.07 ^a	46.40±3.58 ^d	25.00±2.24 ^d	5.00±1.58 ^d	57.00±2.55 ^c	33.60±3.36 ^c	14.60±3.21 ^c	66.80±2.17 ^b	45.40±3.21 ^b	24.20±2.17 ^b
Ciegos	83.40±2.07 ^a	84.20±1.30 ^a	84.60±1.14 ^a	66.00±2.55 ^c	40.40±3.85 ^d	20.20±3.19 ^d	67.00±1.58 ^c	50.40±3.36 ^c	30.20±3.19 ^c	73.20±3.19 ^b	59.00±3.16 ^b	38.80±3.70 ^b
Colon	85.40±3.85 ^a	86.00±1.14 ^a	86.60±1.14 ^a	68.80±0.84 ^d	43.20±1.92 ^d	25.40±2.41 ^d	72.00±1.58 ^c	54.80±2.59 ^c	34.80±1.48 ^c	77.00±1.00 ^b	65.20±1.92 ^b	44.40±2.88 ^b

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en la misma fila difieren a $p < 0.01$ (Duncan, 1955)

En la tabla 13 muestra el seguimiento de *E. coli* en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano, observando en el tratamiento control (0% HSZ y HO) hubo un aumento conforme el ave crecía coincidiendo con investigadores como Van der Wielen et al.,(83) demostraron que la diversidad de la microbiota intestinal aumenta con la edad, especialmente en los ciegos; y en los grupos experimentales en las que se añadió HSZ y HO se observó una notable disminución de colonia de *E. coli* en los diferentes segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) conforme aumenta la edad de los pollos Cobb 500 (7, 22 y 42 días), observando que el grupo del 10% de HSZ y 0.5% HO tuvo una disminución significativa con respecto a los demás grupos experimentales, tal como se manifiesta en la figura 10.

ANEXO 27. *Lactobacillus* spp en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano.

TGI	Niveles de Harina de Semilla de Zapallo (HSZ) y Harina de Orégano (HO)											
	0% HSZ y 0% HO			10% HSZ y 0.5% HO			10% HSZ y 1% HO			10% HSZ		
	7 Dias	23 Dias	42 Dias	7 Dias	23 Dias	42 Dias	7 Dias	23 Dias	42 Dias	7 Dias	23 Dias	42 Dias
Duodeno	10.40±0.55 ^d	12.20±0.45 ^d	14.60±0.55 ^d	13.60±0.55 ^a	15.40±0.55 ^a	17.60±0.55 ^a	12.40±0.55 ^b	14.40±0.55 ^b	16.40±0.55 ^b	11.40±0.55 ^c	13.40±0.55 ^c	15.40±0.55 ^c
Yeyuno	17.40±0.55 ^d	17.80±0.84 ^d	24.00±0.71 ^d	21.80±0.84 ^a	25.40±0.55 ^a	29.00±1.00 ^a	20.40±0.55 ^b	23.40±0.55 ^b	26.40±0.55 ^b	18.80±0.84 ^c	21.80±0.84 ^c	25.40±0.55 ^c
Íleon	23.60±0.56 ^d	25.00±0.71 ^c	28.80±0.84 ^d	28.00±1.00 ^a	30.60±0.89 ^a	34.80±0.84 ^a	26.40±0.55 ^b	29.40±0.55 ^a	32.60±0.55 ^b	24.80±0.84 ^c	27.60±0.89 ^b	30.80±0.84 ^c
Ciegos	5.20±0.45 ^d	5.40±0.55 ^d	9.00±0.71 ^d	8.40±0.55 ^a	10.40±0.55 ^a	12.40±0.55 ^a	7.40±0.55 ^b	9.40±0.55 ^b	11.40±0.55 ^b	6.40±0.55 ^c	8.40±0.55 ^c	10.40±0.55 ^c
Colon	1.10±0.22 ^c	2.00±0.71 ^d	3.30±0.45 ^d	3.40±0.55 ^a	5.40±0.55 ^a	7.40±0.55 ^a	2.40±0.55 ^b	4.40±0.55 ^b	5.60±0.55 ^b	1.40±0.55 ^c	3.40±0.55 ^c	4.40±0.55 ^c

^{a,b,c,d} Medias con letras diferentes en las misma fila difieren a p<0.01 (Duncan, 1955).

En la tabla 14 se aprecia el seguimiento de *Lactobacillus* spp en pollos Cobb 500 alimentados con diferentes niveles de harina de semilla de zapallo y orégano, observando en el tratamiento control (0% HSZ y HO) hubo un aumento conforme el ave aumentaba de edad coincidiendo de igual manera con investigadores como Van der Wielen et al.,(83); y observándose un crecimiento significativo de colonia de *Lactobacillus* spp en los grupos experimentales en las que se añadió HSZ y HO en los diferentes segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) conforme aumenta la edad de los pollos Cobb 500 (7, 22 y 42 días), siendo el grupo del 10% de HSZ y 0.5% HO tuvo una un auemnto significativa con respecto a los demás grupos experimentales (T2 10% HSZ - 1% HSO y T3 10% HSZ), tal como se manifiesta en la figura 11.