

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LEVADURAS SOBRE LA MORFOMETRÍA DE VELLOSIDADES INTESTINALES Y PRODUCTOS DE LA MICROFLORA EN POLLOS

López N¹, Afanador G², Ariza CJ³

Departamento de Ciencias de la Producción Animal,
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,
Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia.
Laboratorio de Nutrición C. B. B. Corpoica, Mosquera, Colombia.

RESUMEN

Entre las estrategias desarrolladas para mejorar las condiciones funcionales del tracto gastrointestinal (TGI) de las aves se encuentra el empleo de nuevos aditivos funcionales alimenticios, y dentro de estas posibilidades está el uso de levaduras. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial funcional y nutricional de tres diferentes cepas de levaduras aisladas de frutales colombianos y de dos levaduras comerciales, y sus efectos sobre las variaciones en la morfometría de vellosidades intestinales y productos de la microflora del ciego de pollos de engorde. Los pollos se distribuyeron al azar en 6 tratamientos: (tres diferentes cepas de levaduras nativas, dos controles con levaduras comerciales (Levapan® presentación seca y AB vista®) y un control sin levadura. Los datos se analizaron usando el procedimiento GLM de SAS versión 9 (SAS Inst., Inc. Cary, N. C.), se realizaron comparaciones de los promedios utilizando la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Se observaron diferencias estimadas significativas a favor de los pollos de engorde que recibieron las dietas con levaduras en el contenido cecal de ácidos grasos volátiles (propiónico e isobutírico) de 0,13 mmol/ml y 0,03 mmol/ml, respectivamente, a los 8 días de edad de los pollos, y de 0,64 mmol/ml y 0,08 mmol/ml, respectivamente, a los 22 días de edad. A los 22 días de edad se encontraron diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos con levaduras; el control presentó criptas más profundas en el duodeno y una relación menor altura de la vellosidad/profundidad de la cripta en el yeyuno.

Los efectos tróficos positivos sobre la mucosa digestiva asociados al uso de levaduras en la alimentación de pollos de engorde, observados en esta investigación, confieren a estas un gran potencial nutricional y sugieren posteriores estudios que abarquen el ciclo completo de producción, involucrando otros factores relacionados con la capacidad de absorción de nutrientes.

Palabras clave: aditivos, nutrición, aves, tracto gastrointestinal, morfometría, ácidos grasos volátiles.

1 nlopezh@unal.edu.co

2 gafanadort@unal.edu.co

3 cariza@corpoica.org.co

EVALUATION EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF YEASTS ON THE MORPHOMETRY OF INTESTINAL VILLUS AND PRODUCTS OF THE MICROFLORA IN CHICKENS

ABSTRACT

One of the strategies developed to improve the functional conditions of the gastrointestinal tract (GIT) of broilers is the use of alternative nutritional and functional additives. Among these alternatives, it has been recently evaluated the supplementation of yeasts in poultry feeding systems. In this context, the objective of this study was to evaluate the potential functional and nutritional role of 3 different strains of isolated yeasts from native fruits of Colombian ecosystems in males broiler and its effects on the variations of intestinal villus morphometry and products of the cecal microflora. The chicks were distributed at random in 6 treatments: 0,5% of the diet of 3 different native yeasts, two controls with commercial yeasts (Levapan® dry presentation and AB vista®) and a control group without yeast. They were carried out comparisons of the means with a level of significance of $P < 0,05$ by SAS program version 9. Significant differences were observed in favor of the chickens that received the diets with yeasts in terms of their cecal contents of volatile fatty acids (propionic and isobutyric) at 8 and 22 days of age (0,13 mmol/ml and 0,03 mmol/ml and 0,64 mmol/ml and 0,08 mmol/ml, respectively) ($P < 0,05$). At 22 days of age, the control group showed significant differences with supplemented groups of yeasts ($P < 0,05$). Crypts of duodenum were deeper in the control group compared with supplemented groups and the height of villus/deep of the crypt ratio were also smaller in yeyuno of the control group. In summary, the results of this study showed that yeasts had a relevant functional properties for their use as alternative additive in the feeding systems of broilers.

Key words: food additive, broiler, gastrointestinal tract, morphology, volatile fatty acids.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la eficiencia productiva de los pollos de engorde puede ser alcanzado en el futuro inmediato mediante desarrollos que promuevan un mejor entendimiento y manipulación de los mecanismos que regulan la disponibilidad y utilización de nutrientes en el tracto gastrointestinal (TGI). Dentro de las estrategias diseñadas para mejorar las condiciones estructurales del TGI se encuentra el empleo de nuevos aditivos nutricionales (1), productos que optimizan los procesos de absorción de nutrientes, fortaleciendo el estado de la barrera intestinal y de la microbiota, por lo cual se disminuyen los costos de mantenimiento digestivo, se mejora la respuesta inmune y, finalmente, se garantiza la productividad y

efectividad de la carne de pollo en el mercado (2).

Las levaduras se consideran como una de las alternativas más promisorias para reemplazar el uso de los antibióticos promotores de crecimiento (APC), pues facilitan y apoyan la relación simbiótica entre el huésped y su microflora. Los beneficios empíricos de las levaduras sobre la salud y la productividad han sido documentados en diferentes estudios (2-6). Sin embargo, como ocurre con la mayoría de los nuevos aditivos naturales, los mecanismos de acción específicos de las levaduras no han sido claramente definidos. Estos beneficios podrían estar asociados primero con la disponibilidad de nutrientes presentes en la levadura, como proteínas, aminoácidos, minerales y vitaminas, que pueden ser usados

por el animal cuando la levadura muere; segundo, la levadura también puede producir numerosas enzimas (proteasas, peptidasas, hidrolasas, maltasas, fosfatasas, galactosidasas, etc.), las cuales pueden ser liberadas en el intestino y reforzar de esta manera la acción de las enzimas endógenas, facilitando la digestión del alimento (7).

En general los diferentes estudios muestran efectos diversos del uso de las levaduras en la alimentación de aves, como la modificación de la digestibilidad de nutrientes, el desarrollo de la mucosa digestiva y la reducción de la colonización por bacterias patógenas y disminución de efectos adversos de metabolitos secundarios como las micotoxinas (2-6).

De otra parte, la utilización de la energía neta por las aves está determinada en buena medida por los requerimientos para el mantenimiento y crecimiento del intestino (8) y por el área superficial de este órgano. Esto último depende del grado de desarrollo de la macroestructura morfológica: la longitud y el área trasversal de los segmentos duodeno, yeyuno e íleon, y por su estructura morfométrica, es decir, la altura de las vellosidades y el área superficial del epitelio, en cada uno de estos segmentos (9, 10).

La cripta puede considerarse como la fábrica de las vellosidades, y una cripta grande indica un rápido cambio de tejido y una alta demanda por un nuevo tejido (11). En un estudio de Bradley *et al.* (12) con pollos de engorde se encontró que la inclusión de levaduras de *Saccharomyces boulardii* (0,2 kg/ton) en el alimento produjo una disminución en el número de células caliciformes, menor profundidad de las criptas y no tuvo un efecto sobre la altura y amplitud de las vellosidades del íleon. Los trabajos de Santín *et al.* (5) y Zhang *et al.* (13) igualmente hacen referencia al efecto trófico de las levaduras sobre la mucosa digestiva y su papel como promotor de desempeño.

Las levaduras en su función de probiótico y prebiótico limitan la colonización de los patógenos a través del cambio del metabolismo del ecosistema microbiano intestinal, incrementando la producción de sustancias antibacteriales, como los ácidos grasos volátiles (AGV), ácido láctico y bacteriocinas (14). Los ácidos grasos de cadena corta o AGV, de 2 a 5 carbonos, como acético, propiónico y n-butírico, son absorbidos y utilizados por el huésped, y la oxidación de estos ácidos suple el 60-70% de las necesidades energéticas de los enterocitos y juegan un importante papel en la homeostasis del lumen intestinal (15-17). En este estudio se evaluó el potencial funcional y nutricional de tres diferentes cepas de levaduras aisladas de frutales colombianos y de dos levaduras comerciales y su efecto sobre la morfometría de las vellosidades del tracto gastrointestinal (TGI) y sobre los productos de la microflora del ciego, en pollos de engorde machos.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

LOCALIZACIÓN

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones de Corpoica Tibaitatá, km 14 vía Bogotá-Mosquera, Colombia, ubicado a 2.547 m. s. n. m., con una temperatura media de 13 °C y precipitación anual de 621 mm.

INSTALACIONES Y EQUIPOS

Las aves se alojaron aleatoriamente en 2 baterías verticales de cría provistas de los elementos necesarios para efectuar todas las mediciones requeridas: comederos de canal para el suministro de las dietas experimentales, bebederos automáticos con copa, fuente eléctrica de calor, rejilla, y bandeja de recolección de heces. La cantidad máxima de aves manejada fue de 15 por corral. La temperatura se mantuvo a partir de la segunda semana entre 23 y 28 °C.

PROGRAMA SANITARIO

Todos los pollos de engorde se sometieron durante el periodo experimental al mismo programa sanitario, de acuerdo con las normas establecidas por Corpoica.

AVES

Se utilizaron 270 pollos machos de la estirpe Hybro recién nacidos, provenientes de una incubadora comercial. Los pollos se preseleccionaron buscando una homogeneidad en el peso corporal (se eliminaron pesos atípicos de más de una desviación estándar de la mediana).

DIETAS EXPERIMENTALES

Se evaluaron 6 dietas comerciales en harina, con y sin la adición de levaduras (nivel de inclusión 0,5% a expensas del contenido de maíz), de acuerdo con un esquema de alimentación por fases: preiniciación (1-7 días de edad) e iniciación (8-24 días de edad). La composición de cada dieta fue de 22% y 21% de proteína cruda y 3.000 y 3.050 kcal/kg de EM para cada fase de alimentación respectivamente. La formulación de las dietas experimentales se realizó utilizando el programa User-Friendly Feed Formulation (Uffda) y se utilizaron los valores de composición de nutrientes reportados en el NRC (18), y ajustadas a su disponibilidad comercial en Colombia (tabla 1). El alimento y el agua de bebida se proporcionaron a voluntad.

Los tratamientos experimentales fueron:

- Tratamiento 1: dieta control sin inclusión de levadura
- Tratamiento 2: dieta con levadura comercial Levapan® presentación seca
- Tratamiento 3: dieta con inclusión de levadura comercial AB vista®
- Tratamiento 4: dieta con inclusión de levadura nativa 1
- Tratamiento 5: dieta con inclusión de levadura nativa 2

- Tratamiento 6: dieta con inclusión de levadura nativa 3

METODOLOGÍA

Tres pollos por réplica por tratamiento los días 8, 15 y 22 del experimento se pesaron y sacrificaron por desplazamiento de la articulación cráneo-cervical. El intestino completo y los ciegos se removieron cuidadosamente de la cavidad corporal, luego se procedió a extraer el contenido cecal de cada ave formando un conjunto/ave por réplica. Este contenido se homogenizó asépticamente para posteriormente determinar el pH y la concentración de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, isobutírico y butírico) en el Laboratorio de Nutrición Centro de Biotecnología y Bioindustria (C. B. B.) de Corpoica.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

Materia prima	Preinicio	Inicio
	Inclusión (%)	
Maíz1	48,67	52,20
Harina de arroz	8,00	8,00
Torta de soya 49	25,43	22,08
Soya extruida	10,00	10,00
Harina de pescado 64	1,50	1,50
Aceite de palma	1,63	1,81
Carbonato Ca	1,25	1,19
Fosfato dicálcico	1,49	1,36
Sal	0,35	0,35
Bicarbonato de Na	0,30	0,30
DL- Metionina	0,22	0,16
L- Lisina HCl	0,27	0,20
L- Treonina	0,12	0,08
Cl. colina 60%	0,07	0,07
Premex min. y vit.	0,70	0,70

¹ Las levaduras se incluyeron en la dieta a expensas del maíz al 0,5%.

Para los análisis histológicos se seleccionó un segmento de 3 centímetros del duodeno, del yeyuno y del íleon (duodeno: desde el píloro hasta la porción distal de la vuelta duodenal; yeyuno: desde la porción distal del giro duodenal al divertículo de Meckel; íleon: desde el divertículo de Meckel hasta el inicio del ciego). Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% y posteriormente los tejidos se sometieron a la rutina histológica con la inclusión del material en parafina. Con el uso de un microtomo se realizaron 8 cortes de 7 mm de espesor marcados con hematoxilina y eosina. En estos cortes, con la ayuda de un microscopio óptico Nico tipo 124 acoplado a un sistema analizador de imágenes: Image Analysis Sistem Leco® 2001, versión 2002, se realizaron las observaciones microscópicas de cambios morfológicos en el Laboratorio de Morfofisiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Se midieron la altura y el ancho de las vellosidades y la profundidad de las criptas en los diferentes segmentos del intestino. Registrando la altura de la vellosidad al inicio del área basal coincidente con la porción superior de la cripta al ápice, se calculó el área aparente de la vellosidad y la relación altura de la vellosidad/cripta. Se realizaron 20 medidas por tejido por ave (19-21).

Determinación de pH

Se tomaron 0,2 g de cada conjunto de muestra de contenido cecal y se suspendieron en 2,4 ml de agua destilada desionizada. Esta mezcla se agitó con perlas de vidrio, posteriormente se insertó en la mezcla un electrodo de pH y se realizaron las lecturas en un potenciómetro (Orion 611 pH-meter, Orion Research, Cambridge, MA). El pH de la suspensión se midió dentro de los 45 minutos subsiguientes al sacrificio de las aves siguiendo las recomendaciones de Hinton *et al.* (22).

Concentración de ácidos grasos volátiles AGV

Se recolectaron 0,4 g de cada conjunto de muestra de contenido cecal en *eppendorfs* que contenían dos perlas de vidrio y 1,6 ml de agua destilada estéril; se agitaron vigorosamente y luego se adicionó ácido sulfúrico puro (2 μ l) para estabilizar la muestra por acidificación (22, 23). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10.000 r. p. m. por 15 minutos, se filtraron (filtro Millipore de 0,2 μ m) y se conservaron a -20 °C, previamente al análisis. Se determinó el contenido de AGV por cromatografía de gases en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL según la técnica descrita por Leedle y Paulissen (24).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los pollos se distribuyeron al azar en 6 tratamientos, 3 réplicas y 15 aves por réplica. Cada piso de la batería contaba con dos corrales donde se alojaron de a 15 aves; el corral se consideró como la unidad experimental. Las variables respuesta se analizaron con un diseño completamente al azar.

Se realizó un análisis de varianza Anova y una prueba de comparación no planeada para observar las diferencias de los tratamientos en los promedios de pH de la digesta del ciego y productos de la microflora a nivel cecal (ácido grasos volátiles: acético, propiónico, isobutírico y butírico). Adicionalmente se realizó una comparación de la estimación de medias de los siguientes contrastes: control vs. levaduras, y levaduras comerciales vs. levaduras nativas, mediante el programa SAS versión 9 (25). Para la comparación de los valores promedio se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0,05$), y valores de probabilidad $P < 0,10$ se consideraron en el análisis como una tendencia.

Los datos de morfometría de vellosidades intestinales se analizaron usando el procedimiento Mixed de SAS versión 9

(SAS Inst., Inc., Cary, NC), con un diseño completamente al azar, usando los valores repetidos de longitud de la vellosidad, profundidad de la cripta, relación vellosidad/cripta y área de la vellosidad a los 8, 15 y 22 días de edad. La unidad experimental fue el corral y el efecto principal evaluado fue el tratamiento. La prueba de relación de verosimilitud (ML) se utilizó para probar cuál estructura de varianza y covarianza se ajustó mejor a los datos usando el algoritmo del residual de máxima verosimilitud (REML). El modelo final se estimó utilizando REML. Se usó la prueba de Tukey para comparar las medias entre tratamientos.

RESULTADOS

MORFOMETRÍA DE LAS VELLOSIDADES INTESTINALES

El efecto de la inclusión de levaduras sobre la dinámica de variables morfométricas del intestino delgado fue significativo ($P < 0,05$) para las variables: área aparente de la vellosidad en duodeno y relación altura de la vellosidad:profundidad de la cripta en los segmentos duodeno y yeyuno. En contraste, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) para las restantes variables evaluadas en los diferentes segmentos. Este comportamiento se mantuvo en los diferen-

tes tiempos de evaluación: 8, 15 y 22 días de edad.

El efecto promedio de la inclusión de levaduras en dietas de pollos de engorde machos sobre la dinámica de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta del duodeno se muestra en la figura 1. Se observan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). A los 22 días de edad los valores promedio de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta de los pollos que recibieron los tratamientos control y Levapan® fueron más altos (6,75 y 6,79, $\mu\text{m}/\mu\text{m}$, respectivamente) comparados con los valores promedio de los pollos que recibieron el tratamiento levadura nativa 2 (5,44 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$). No se presentaron diferencias entre los tiempos (edades 8, 15 y 22 días).

El efecto de la inclusión de levaduras sobre la dinámica de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta del yeyuno se muestra en la figura 2. Se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P < 0,05$). A los 22 días de edad el valor promedio de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta de los pollos que recibieron levadura nativa 3 fue más alto (6,54 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) que el valor promedio del control (4,49 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$); los valores de los pollos que recibieron las

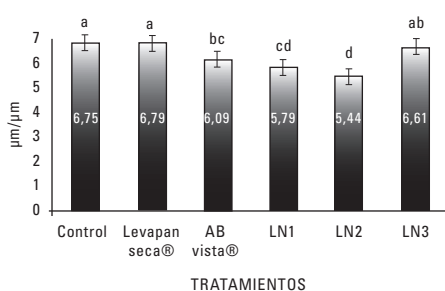


Figura 1. Efecto de la inclusión de levaduras comerciales y nativas sobre la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta del duodeno de pollos de engorde machos a los 22 días de edad.

a, b, c, d Entre series, promedios con distinta letra son diferentes estadísticamente. $P < 0,05$; ns = $P > 0,05$.

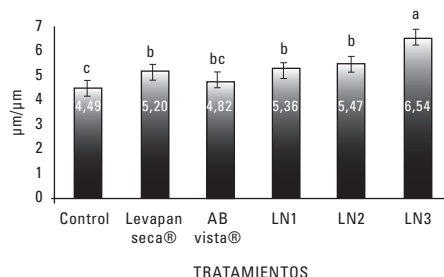


Figura 2. Efecto de la inclusión de levaduras comerciales y nativas sobre la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta del yeyuno de pollos de engorde machos a los 22 días de edad.

a, b, c, d Entre series, promedios con distinta letra son diferentes estadísticamente. $P < 0,05$; ns = $P > 0,05$.

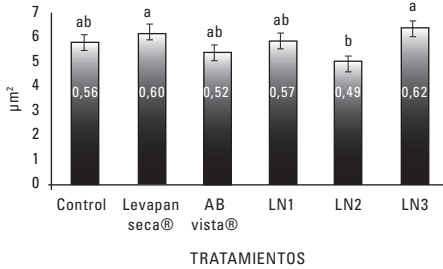


Figura 3. Efecto de la inclusión de levaduras comerciales y nativas sobre el área aparente de la vellosidad del duodeno de pollos de engorde machos a los 22 días de edad.

a, b, c, d Entre series, promedios con distinta letra son diferentes estadísticamente. $P < 0,05$; ns = $P > 0,05$.

levaduras Levapan®, AB vista®, levaduras nativas 1 y 2, fueron similares entre sí. Se presentaron diferencias en el tiempo, con valores promedio de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta de 4,02, 4,67 y 5,31 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$, a los 8, 15 y 22 días de edad respectivamente.

El efecto promedio de la inclusión de levaduras en dietas de pollos de engorde machos sobre la dinámica del área aparente de la vellosidad del duodeno se muestra en la figura 3. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). A los 22 días de edad el promedio del área aparente de la vellosidad del duodeno de los pollos que recibieron levadura nativa 3 (0,62 μm^2) y Levapan® (0,60 μm^2) fue más alto comparado con la levadura nativa 2 (0,49 μm^2). Se presentaron diferencias en el tiempo, con valores promedio de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la

cripta de 0,39, 0,47 y 0,56 μm^2 , a los 8, 15 y 22 días de edad respectivamente.

PRODUCTOS DE LA MICROFLORA DEL CIEGO Y PH DE LA DIGESTA CECAL

El efecto de la inclusión de levaduras a los 8 días de edad, sobre el pH de la digesta del ciego y los productos de la microflora en el ciego (ácidos grasos volátiles acético, propiónico, isobutírico y butírico), se muestra en la tabla 2. Se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en el valor de pH y contenido de isobutírico. El promedio de pH del contenido cecal fue más alto en el grupo levadura nativa 2 (6,66), el cual difirió de los grupos control, Levapan®, AB vista®, levadura nativa 1 y levadura nativa 3 ($P < 0,05$), los cuales fueron similares entre sí. Los pollos con inclusión de levaduras comerciales (Levapan® y AB vista®) comparados con los pollos que recibieron las levaduras nativas (1, 2 y 3) presentaron un menor valor de pH del contenido cecal, con una diferencia estimada de 0,30 ($P < 0,05$) (tabla 2).

Con relación al contenido de ácido isobutírico a nivel cecal, los promedios más altos se observan en los grupos que recibieron AB vista® y levadura nativa 2 (0,15 y 0,16 mmol/ml respectivamente). Los pollos que recibieron la dieta control, comparados con los pollos con levaduras, presentaron un menor contenido de ácido isobutírico, con una diferencia estimada de 0,03 mmol/ml ($P < 0,017$) (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la inclusión de levaduras comerciales y nativas sobre el pH de la digesta del ciego y los productos de la microflora a nivel cecal (ácidos grasos volátiles acético, propiónico, isobutírico y butírico) de pollos de engorde machos a los 8 días de edad.

Tratamiento	Día 8				
	pH	Acético (mmol/ml)	Propiónico (mmol/ml)	Butírico (mmol/ml)	Isobutírico (mmol/ml)
Control	6,00 b	15,09	0,95	2,58	0,09 b
Levapan®	5,88 b	19,66	1,02	3,59	0,09 b
AB vista®	6,10 b	16,17	1,00	2,30	0,15 a
Levadura nativa 1	6,08 b	19,33	0,89	3,13	0,12 ab
Levadura nativa 2	6,66 a	18,86	1,47	2,64	0,16 a
Levadura nativa 3	6,14 b	19,75	1,02	3,02	0,08 b
Significancia	***	Ns	*	ns	***
Error est. Media	0,18	3,47	0,23	0,74	0,02
Contrastes			Probabilidad		
Control vs. levaduras	0,146	0,119	0,377	0,455	0,017
Comerciales vs. nativas	0,007	0,459	0,370	0,980	0,703
Parámetro			Diferencia estimada		
Control vs. levaduras	-0,17	-3,67	-0,13	-0,36	-0,03
Comerciales vs. nativas	-0,30	-1,40	-0,11	0,01	-0,003

^{a, b, c, d} Dentro de una misma columna, promedios con distinta letra son diferentes estadísticamente. P<0,05; ns = P>0,05.

El efecto de la inclusión de levaduras a los 15 días de edad, sobre el pH de la digesta del ciego y los productos de la microflora en el ciego (ácidos grasos volátiles acético, propiónico, Isobutírico y butírico), se muestra en la tabla 3. Se presentaron diferencias significativas (P<0,05) en el valor de pH y contenido de ácido acético en el ciego, y el valor promedio de pH del contenido cecal más alto fue para el grupo levadura nativa 2 (6,55), el cual difirió de Levapan® y levadura nativa 1 (5,80 y 5,76 respectivamente) (P<0,05); estos muestran valores similares entre sí (P>0,05).

En relación con el contenido de ácido acético en el ciego, el promedio más alto se presentó en las aves que recibieron levadura nativa 3 (24,30 mmol/ml), el cual difirió estadísticamente de AB vista® y levadura nativa 1 (12,89 y 14,42 mmol/ml respectivamente) (P<0,05); estos muestran valores similares entre sí (P>0,05). Los pollos que recibieron levaduras comerciales (Levapan® y AB vista®) comparados con los pollos que recibieron levaduras nativas 1, 2 y 3 presentaron un menor contenido de ácido acético, con una diferencia estimada de 3,99 mmol/ml (P<0,034) (tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la inclusión de levaduras comerciales y nativas sobre el pH de la digesta del ciego y los productos de la microflora del mismo (ácidos grasos volátiles acético, propiónico, isobutírico y butírico), de pollos de engorde machos a los 15 días de edad.

Tratamiento	Día 15				
	pH	Acético (mmol/ml)	Propiónico (mmol/ml)	Butírico (mmol/ml)	Isobutírico (mmol/ml)
Control	5,97 ab	19,26 ab	1,27	5,71	0,10
Levapan®	5,80 b	17,24 ab	1,38	5,11	0,09
AB vista®	5,98 ab	12,89 b	0,96	3,93	0,12
Levadura nativa 1	5,76 b	14,42 b	1,00	3,73	0,06
Levadura nativa 2	6,55 a	18,44 ab	1,26	4,61	0,12
Levadura nativa 3	6,06 ab	24,30 a	1,39	4,78	0,14
Significancia	**	**	ns	ns	ns
Error est. Media	0,23	3,16	0,28	1,01	0,03
Contrastes	Probabilidad				
Control vs. levaduras	0,661	0,384	0,683	0,068	0,775
Comerciales vs. nativas	0,077	0,034	0,770	0,784	0,782
Parámetro	Diferencia estimada				
Control vs. levaduras	-0,07	1,81	0,07	1,28	-0,01
Comerciales vs. nativas	-0,23	-3,99	-0,04	0,15	-0,01

^{a, b, c, d} Dentro de una misma columna, promedios con distinta letra son diferentes estadísticamente. $P < 0,05$; ns = $P > 0,05$.

El efecto de la inclusión de levaduras a los 22 días de edad, sobre el pH de la digesta del ciego y los productos de la microflora en el ciego (ácidos grasos volátiles acético, propiónico, isobutírico y butírico), se muestra en la tabla 4. Se presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el valor de pH y contenido de ácidos butírico e isobutírico a nivel cecal. El valor promedio de pH del contenido cecal fue más alto en el tratamiento levadura nativa 1 (7,03), el cual difirió del valor encontrado para la levadura nativa 2 (6,12) ($P < 0,05$) (tabla 4).

En relación con el contenido de ácido butírico en el ciego, el valor promedio más alto se presentó en el grupo que recibió AB vista® (6,76 mmol/ml), el cual difirió del tratamiento Levapan® (3,80 mmol/ml)

($P < 0,05$). Los pollos que recibieron la dieta control (0,12 mmol/ml) presentaron menor contenido de ácido isobutírico comparados con los pollos que recibieron levaduras nativas 2 y 3 (0,17 y 0,19 mmol/ml, respectivamente). Los pollos que recibieron la dieta control, comparados con los pollos que recibieron levaduras, presentaron menor contenido de ácido isobutírico, con una diferencia estimada de 0,08 mmol/ml ($P < 0,001$). En contraste, los pollos que recibieron levaduras comerciales (Levapan® y AB vista®), comparados con los pollos que recibieron levaduras nativas 1, 2 y 3, presentaron mayor contenido de ácido isobutírico, con una diferencia estimada de 0,04 mmol/ml ($P < 0,034$) (tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la inclusión de levaduras comerciales y nativas sobre el pH de la digesta del ciego y los productos de la microflora en el ciego (ácidos grasos volátiles acético, propiónico, isobutírico y butírico) de pollos de engorde machos a los 22 días de edad.

Tratamiento	Día 22				
	pH	Acético (mmol/ml)	Propiónico (mmol/ml)	Butírico (mmol/ml)	Isobutírico (mmol/ml)
Control	6,63 ab	18,24	1,32	4,42 ab	0,12 b
Levapan®	6,71 ab	18,04	1,75	3,80 b	0,21 ab
AB vista®	6,53 ab	22,43	2,50	6,76 a	0,22 ab
Levadura nativa 1	7,03 a	23,69	1,63	4,52 ab	0,17 ab
Levadura nativa 2	6,12 b	18,78	1,86	5,78 ab	0,17 a
Levadura nativa 3	6,55 ab	22,58	2,04	5,75 ab	0,19 a
Significancia	***	ns	*	**	***
Error est. Media	0,27	3,84	0,52	1,17	0,03
Contrastes			Probabilidad		
Control vs. levaduras	0,782	0,189	0,038	0,180	0,001
Comerciales vs. nativas	0,652	0,419	0,249	0,894	0,034
Parámetro			Diferencia Estimada		
Control vs. levaduras	0,04	-2,87	-0,64	-0,90	-0,08
Comerciales vs. nativas	0,06	-1,45	0,28	-0,07	0,04

a, b, c, d Dentro de una misma columna, promedios con distinta letra son diferentes estadísticamente. P<0,05; ns = P > 0,05.

DISCUSIÓN

En este estudio, el efecto de la inclusión de levaduras sobre la morfometría intestinal y el contenido AGV del ciego a los 22 días de edad, muestra que en el grupo de pollos que recibió la levadura nativa 3 se presentaron los valores más altos de la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta en el segmento yeyuno, en comparación con los pollos del grupo control. Además, en el grupo control se observaron los contenidos más bajos de los ácidos propiónico e isobutírico, comparado con los grupos que recibieron levaduras.

Los cambios en la morfología intestinal, como vellosidades más cortas y criptas más profundas, han sido asociados con la presencia de toxinas (11). Una vellosidad corta

disminuye la superficie de absorción de nutrientes; un alargamiento de la vellosidad indica una rápida reconversión del tejido y una alta demanda por nuevos tejidos (11). Muchos investigadores encuentran una estrecha correlación entre la profundidad de la cripta y las tasas de proliferación de células epiteliales (26-29). Además, el número de proliferaciones y el recambio celular epitelial tienen un gran impacto sobre los requerimientos de proteína y energía de la mucosa del intestino delgado (20).

Zhang *et al.* (13) observaron alturas de las vellosidades más altas en aves suplementadas con levaduras y pared celular de levaduras. Similarmente, Santin *et al.* (5) encontraron aumentos en la altura de las vellosidades en los diferentes segmentos

intestinales en pollos suplementados con 0,2% de paredes celulares de *S. cerevisiae*, y sugieren que las paredes celulares de levadura pueden tener un efecto trófico indirecto en la mucosa intestinal. Bradley *et al.* (12) hallaron reducciones en el número de células caliciformes y en la profundidad de la cripta en la mucosa del íleon, cuando los pollos eran suplementados con *S. cerevisiae*, lo que sugiere que el uso de *S. cerevisiae* reduce condiciones de estrés en la mucosa intestinal causadas por bacterias o por toxinas.

Kubena *et al.* (30) utilizaron un producto de exclusión competitiva para reducir los efectos de las micotoxinas en pollos desafiados por *Salmonella typhimurium*, y encontraron que, en las aves que no fueron suplementadas con el aditivo funcional, se presentaron bajos contenidos de ácido propiónico en el ciego, reduciéndose la resistencia a la colonización de *Salmonella* spp. En este sentido, Barnes *et al.* (31) informaron que las concentraciones AGV cecales son indicadores de crecimiento de la microflora anaerobio. Nisbet *et al.* (32, 33) y Corrier *et al.* (34) demostraron una correlación entre la concentración cecal del ácido propiónico en pollos de 3 días de edad, con el establecimiento de la microflora anaerobia del ciego y la protección contra la colonización por *Salmonella typhimurium*. Igualmente, Nisbet *et al.* (33) observaron una protección significativa con 7,5 μmol por gramo de contenido cecal de ácido propiónico, contra *Salmonella* spp.

Iji *et al.* (35) determinaron concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en pollos de 15 días de edad de 26,3, 0,9 y 5,0 mmol/g de digesta, respectivamente, en dietas suplementadas con MOS. Comentan que las concentraciones altas de ácidos grasos volátiles son indicativas de importantes fermentaciones por bacterias anaerobias estrictas.

Muchos investigadores muestran cómo la levadura en cervecería mejora la eficacia del sistema inmune, incrementa la salud en el lumen intestinal y favorece la digestión y la absorción de nutrientes, lo cual, en conjunto, responde a un mejor comportamiento del pollo de engorde (6, 36-38). Estos desarrollos pueden detectarse desde la primera semana de vida en pollos de engorde machos (5). Por otra parte, los factores involucrados en la integralidad del intestino tienen consecuencias importantes para la eficiencia alimenticia, debidas a que la capacidad de absorción de nutrientes de cada segmento del intestino es proporcional al número de vellosidades presentes, así como al tamaño y área de la superficie disponible para la absorción (4).

La inclusión de levaduras afectó a la dinámica de los AGV en el ciego. Un aumento en sus diferentes proporciones sugeriría una mayor disponibilidad de material fermentativo en esta área. Se podría pensar que las variaciones en los tipos de flora en el intestino grueso darían como resultado una alteración en los productos de degradación que llegan al ciego y, por otra parte, variaciones en la digestibilidad de los carbohidratos que dan como resultado un sustrato diferente para esta microflora. Una menor llegada de carbohidratos solubles causaría disminución de la proporción de propionato o un mayor aprovechamiento de fracciones fibrosas. En este caso, en el grupo control se observaron los contenidos más bajos de los ácidos propiónico e isobutírico, comparado con los grupos que recibieron levaduras.

CONCLUSIONES

De las condiciones del estudio descritas podemos concluir: i) La relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta del duodeno fue más alta en los grupos control y Levapan® comparados con la levadura nativa 2. ii) La cripta fue más alta para los pollos

que recibieron levadura nativa 3 comparados con el grupo control y la relación altura de la vellosidad vs. profundidad de la cripta tuvo un comportamiento dinámico durante los primeros 22 días de edad. iii) El área aparente de la vellosidad del duodeno de los pollos que recibieron levadura nativa 3 fue más alta comparada con la de los pollos de levadura nativa 2; esta variable no presentó un comportamiento dinámico durante los 22 días de edad. iv) El valor promedio de pH del contenido cecal fue más alto en el tratamiento levadura nativa 1 comparado con el de levadura nativa 2, y los pollos que recibieron la dieta control comparados con los pollos que recibieron levaduras presentaron menor contenido de ácido isobutírico. En contraste, los pollos que recibieron levaduras comerciales (Levapan® y AB vista®), comparados con los pollos que recibieron levaduras nativas 1, 2 y 3, presentaron un mayor contenido de ácido isobutírico.

REFERENCIAS

1. Bedford MR. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *W Poult Sci J* 2000; 56:347-65.
2. Morales R. Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde (tesis M. Sc.). Departament de Ciències Animals I Dels Aliments. Universidad Autònoma de Barcelona; 2007.
3. Morales R, Francesch M, Auclair E, García F, Ducatelle R, Van Immerseel F, Andrea N, Brufau J. Uso de paredes celulares de levadura en dietas para pollos con alto y bajo contenido de polisacáridos no amiláceos y su influencia sobre la productividad, la fisiología digestiva y la inmunidad; 2005.
4. Pelicano ERL, Alves P, Alves HB, Oba A, Norkus EA, Kodawara LM, Azevedo TM. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes prebióticos. *Rev Port Cienc Vet* 2003; 98(547):125-34.
5. Santin E, Maiorka A, Macari M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Appl Poult Res* 2001; 10:236-44.
6. Newman K. Mannan-oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. In: *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 10th annual symposium*; 1994.
7. Sparks M, Paschertz, Kamphues J. Yeast different sources and leves as protein source in diets of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism. *J. Ani. Physiol. Ani. Nutr.* 89: 184-188. 2005.
8. Choct M. Soluble non-starch polysaccharides affect net utilisation of energy by chickens. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia 1999*; 12:31-5.
9. Jin S, Corless A, Sell JL, Jin SH. Digestive system development in post-hatch poultry. *World's Poultry Science Journal* 1998; 54:335-45.
10. Iji PA. The impact of cereal non-starch polysaccharides on intestinal development and function in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* 1999; 55(4):375-87.
11. Yason CV, Schat KA. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: Clinical signs and virology. *Am J Vet Res* 1987; 48:977.
12. Bradley GL, Savage TF, Timm KI. The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldarii on male poult performance and ileal morphology. *Poult Sci* 1994; 73:1766-70.
13. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, An GH, Song KB, Lee CH. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science* 2005; 84:1015-21.

14. Sakata T, Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A, Shineha R, Nishihira T, Satomi S. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation. *Rat Dig Dis Sci* 1999; 44:2119-23.
15. Roediger WEW. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 1980; 21:793-98.
16. Roediger WEW. The place of short-chain fatty acids in colonocyte metabolism in health and ulcerative colitis: The impaired colonocyte barrier. In: Cummings JH, Romeau JL, Sakata T, editors. *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995. p. 337-51.
17. Berghman LR, Abi-Ghanem D, Waghela SD, Ricke SC. Antibodies: An alternative for antibiotics? *Poult Sci* 2005; 84:660-66.
18. National Research Council. *Nutrient requirements of poultry*. 9th Rev. edition. Washington: National Academy Press; 1994.
19. Maiorka A, Silva AVF, Santin E, Borges SA, Boleli IC, Macari M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 200; 52(5).
20. Hughes RJ. *Energy metabolism of chickens. Physiological limitations. A report for the rural industries research and development corporation*. Australia; 2003.
21. Xiaolun S. *Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets*. Thesis submitted to Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Animal and Poultry Sciences, August 10, 2004. Blacksburg, Virginia; 2004.
22. Hinton A, Jr., Corrier DE, Spates GE, Norman JO, Ziprin RL, Beier RC, DeLoach JR. Biological control of *Salmonella typhimurium* in young chickens. 1990; 34(3):626-33.
23. Van Der Wielen PW, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BA, van Knipen F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:2536-40.
24. Leedle JPJ, Paulissen B. Factors affecting the in vitro production of volatile fatty acids by mixed bacterial population from the bovine rumen. *Journal of Animal Science* 1989; 67:1593-1602.
25. SAS. *Statistical Analysis System Institute Inc. SAS/STAT. Version 9. Users guide statistical analysis system*; 2002.
26. Hampson DJ, Kidder DE. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Res Vet Sci* 1986 Jan; 40(1):24-31.
27. Jin L, Reynolds LP, Redmer DA, Caton JS, Crenshaw JD. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation, and morphology in growing pigs. *J Anim Sci* 1994; 72(9):2270-78.
28. Brunsgaard G. Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. *Journal of Animal Science* 1998; 76(11):2787-98.
29. Yasar S, Forbes JM. Performance and gastrointestinal response of broiler chickens fed on cereal grain-based feeds soaked in water. *Br Poult Sci* 1999; 40:65-76.
30. Kubena RH, Bailey, Byrd JA, Young CR, Corrier DE, Stanker LH, Rottinghaus GE. Cecal volatile fatty acids and broiler chick susceptibility to *Salmonella typhimurium* colonization as affected by aflatoxins and T-2 toxin1 L. F. P.; 2001.
31. Barnes EM. Ecological concepts of the anaerobic flora in the avian intestine. *Am J Clin Nutr* 1977; 30:1793-98.
32. Nisbet DJ, Ricke SC, Scanlan CM, Corrier DE, Hollister AG, DeLoach JR. Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot* 1994; 57:12-15.

33. Nisbet DJ, Corrier DE, Ricke SC, Hume ME, Byrd JA, DeLoach JR. Cecal propionic acid as a biological indicator of the early establishment of a microbial ecosystem inhibitory to *Salmonella* in chicks. *Anaerobe* 1996 December; 2(6):345-50.
34. Corrier DE, Hinton A, Jr., Ziprin RL, Beiber RC, DeLoach JR. Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. *Avian Diseases* 1990; 34:617-25.
35. Iji PA, Saki AA, Tivey DR. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 81(12):1186-92.
36. Valdivie M. *Saccharomyces* yeast as a by-product from alcohol production on final molasses in diets for broilers. *Cuban J Agric Sci* 1975; 9:327-31.
37. Oyoyo BA, DeLoach JR, Corrier DE, Norman JO, Ziprin RL, Mollenhauer HH. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with d-mannose. *Poultry Sci* 1989; 68:1357-60.
38. Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poult Sci* 2000; 79:205-11.