

**ADICIÓN DE POLEN APÍCOLA
EN LA DIETA DE POLLOS PARRILLEROS.
DINÁMICA MICROBIANA EN EXCRETAS CRUDAS
E INTESTINO DELGADO**



KUNUSCH, ROMINA BELÉN

Tutora

Mgtr. Med. Vet. Fernández, Hebe Tania

Consejeras

Dra. Ing. Agr. Piñeiro, Verónica Ana

Dra. Med. Vet. De Abreu Rosas, Claudia

Consejeras externas

Mgtr. Ing. Agr. Salerno, Carmen Matilde

Ing. Agr. Fernández Etchegaray, Victoria

Noviembre de 2024



*Qué son mil batallas cuando la bandera flamea bajo el sol,
deslumbrante en el cielo.*

*Qué escudo ha sido el más fiel, si la Fe ha permanecido en el ser,
haciendo el infinito más cercano.*

ROMINA KUNUSCH



AGRADECIMIENTOS

Las palabras y el espacio para expresar este reconocimiento se tornan escasos.

Agradezco a Dios por darme luz, fuerza, consuelo, asistencia y seguridad en el alma, para llegar a lograr esta meta tan preciada para mí.

Por el apoyo económico y emocional. Por ser ejemplo de trabajo, lucha, perseverancia y, por sobre todo, personas de bien. Por ser mi familia y mi refugio. Les agradezco infinitamente a mi padre José, y a mis hermanos Leandro y Federico.

A mi abuela Marta, a quien le guardo un amor profundo por haber sido una compañera excepcional e incondicional en cada paso de mi vida. A mis tías.

A mi hermana de la vida, Angie.

A mis amigas y colegas, personas de sacrificio, persistencia, consuelo y compañía. “Mis *polluelas*”, Eri y Bel.

A los muchachos, Damián y Leandro, socios en la crianza de los pollos y amigos.

Al equipo de la Unidad de Experimentación Avícola. Ejemplo de docentes, con la calidez humana que abraza y alienta a continuar. A Hebe, por recibirme siempre con mucho cariño y acompañarme en este proceso. A Claudia y Vero por sus aportes, disposición y su recepción siempre afectuosa. A Vicky por su acompañamiento, aportes y disposición.

A Carmen, quien supo ser y es mi escalón de impulso para continuar, disfrutar y concluir este ciclo. Siempre apoyándome, abriéndome las puertas del laboratorio, de su casa y de su corazón, adoptándome en sus últimos pasos por la universidad. ¡Gracias, Carmen! Porque para mí, has sido una mentora y un aliciente.

Por último, además de ser un agradecimiento, esto es una dedicatoria. Para mi ángel, esa estrella que brilla en la eternidad; quien me dio la vida y fue un ejemplo de amor, fuerza, fe y esperanza. A la persona que siempre creyó en mí. Quien me acompañó en vida y aún lo hace más allá del cielo. Para mi madre, Adriana.

¡GRACIAS!

RESUMEN

La producción de pollos parrilleros se destaca por su versatilidad en cuanto a la velocidad de obtención del producto y dinamismo del proceso, lo que conduce al constante desarrollo de mejoras que influyan positivamente en la salud, crianza y bienestar animal. El uso de aditivos, probióticos, prebióticos y compuestos nutracéuticos ha aportado resultados beneficiosos al suministrarse en una dieta sustentable. Se ha demostrado que estos pueden optimizar la efectividad de los nutrientes presentes en el alimento, su disponibilidad y absorción en el tracto gastrointestinal, además de modular la microbiota de los animales, promoviendo su crecimiento y productividad. Se investigó el uso de polen apícola como complemento nutricional en la dieta de pollos parrilleros, analizando la dinámica de los grupos microbianos presentes en excretas crudas e intestino delgado. La crianza de las aves se realizó en la Unidad de Experimentación Avícola del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Los pollitos de un día de edad fueron alimentados con formulado iniciador hasta el día 21. El día 22 se pesaron y se dividieron al azar en tres tratamientos: CONTROL (sin agregado de polen), POLEN I con 1% de polen apícola y POLEN II con 2% de polen apícola. Se realizaron pruebas microbiológicas en heces a los 21, 28 (primera semana de consumida las dietas experimentales) y 42 días (previo a faena). A los 43 días, se realizó la faena y se extrajo la porción media del intestino delgado, vacío de contenido, para su posterior análisis microbiológico, los cuales se realizaron por el método de diluciones seriadas. Sobre las muestras de excretas e intestino delgado, se llevaron a cabo los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras, bacterias ácido lácticas, y la determinación del número más probable de coliformes totales y fecales. A su vez, se determinó la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. El agregado de PA aumentó el conteo de BAL a los 28 y 42 días en excretas. El agregado de distintas concentraciones de polen produjo, a los 28 días una ligera disminución de la población microbiana de RHP en las excretas de los pollos, mientras que a los 42 días no se observaron diferencias estadísticas. El menor nivel de HL se observó, a los 28 días, en las excretas de PI y, a los 42 días, en el tratamiento C. No se encontró presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras analizadas. El desarrollo promisorio de las BAL a los 42 días, en su calidad de potenciales probióticos, contribuiría a la mejora en la salud y el bienestar del animal a lo largo del proceso de crianza. Por consiguiente, el polen apícola favorecería la proliferación de este grupo benéfico en el tracto gastrointestinal, mejorando la calidad de las excretas crudas.

Palabras clave: aves, microbiota, probióticos, productos apícolas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- PRODUCCIÓN AVÍCOLA	1
1.1.- Contexto mundial y nacional	1
1.2.- Producción del pollo parrillero	2
2.- TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS AVES	3
2.1.- Microbiota intestinal.....	4
2.1.1.- Funciones e importancia de la microbiota intestinal.....	5
2.1.2.- Mecanismos de colonización de la microbiota intestinal.....	5
2.1.3.- Colonización progresiva de la microbiota del tracto gastrointestinal en pollos parrilleros	6
2.1.4.- Impacto de la dieta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal.....	8
3.- Polen apícola como complemento en la dieta de pollos parrilleros. Una propuesta novedosa.....	9
3.- HIPÓTESIS	13
4.- OBJETIVOS	13
4.1.- Objetivo General	13
4.2.- Objetivos Específicos	13
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1.- Lugar de trabajo.....	14
5.2.- Instalaciones.....	14
5.3.- Animales y manejo.....	15
5.5.- Dietas experimentales	16
5.6.- Faena	19
5.7.- Muestreo de heces e ID	19
5.8.- Procesamiento de muestras	20
5.9.- Determinaciones microbiológicas.....	20
5.9.1.- Recuento heterotrófico en placa (RHP)	21
5.9.2.- Hongos y levaduras (HL).....	21
5.9.3.- Bacterias ácido lácticas (BAL).....	21
5.9.4.- Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF).....	22
5.9.5.- <i>Salmonella</i> spp.	22

5.10.- Medición de pH intestinal.....	23
5.11.- Análisis estadístico	23
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6.1.- Efecto de la dieta sobre los parámetros microbiológicos de excretas crudas	24
6.1.1.- Recuento heterotrófico en placa.....	25
6.1.2.- Hongos y Levaduras	25
6.1.3.- Bacterias ácido lácticas.....	25
6.2.- INTESTINO.....	26
6.2.2.- pH	28
6.3.- <i>Salmonella</i> spp.....	29
7.- CONCLUSIONES	30
8.- ANEXO.....	31
9.- BIBLIOGRAFÍA	35
9.1.- RECOMENDACIONES BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUCCIÓN

1.- PRODUCCIÓN AVÍCOLA

1.1.- Contexto mundial y nacional

En el año 2023 se produjeron 139,69 millones de toneladas de carne aviar a nivel mundial. Este volumen posicionó a la actividad avícola en primer lugar, por encima de la carne porcina (122,59 millones de t) y de la bovina (76,25 millones de t) (OECD - FAO, 2023). Además, conforme van pasando los años, la producción de carne de pollo se incrementa. En 2023 el aumento registrado fue de 1,63% respecto de 2022 (Ministerio de Economía, 2023).

La República Argentina ocupa el onceavo lugar a nivel mundial como país productor y se posiciona quinta en Latinoamérica. Como país exportador se encuentra en el décimo lugar, con un aporte de 160 mil t. En 2023 se produjeron 2,3 millones de t (Ministerio de Economía, 2023), y se registró una disminución de 1,4% de la producción nacional respecto de 2022. Este descenso se debió al ingreso de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) por primera vez al país en febrero de 2023. La enfermedad se detectó en aves silvestres en la provincia de Jujuy, con una variante de alta patogenicidad (H₅N₁). Rápidamente se propagó en aves de traspatio y alcanzó una granja rionegrina productora de pollos parrilleros. Luego, se extendió por Tierra del Fuego, Buenos Aires y Chubut, y afectó incluso a mamíferos marinos. Por tal motivo, Argentina perdió su estatus como país libre de influenza aviar.

El siete de agosto de ese mismo año, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) validó el informe de SENASA que autodeclara a Argentina como país libre de IAAP. Los brotes causaron la muerte de 1.443.388 ponedoras (en Chubut, Neuquén, Río Negro, Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba), 78.297 reproductores (en Buenos Aires y Santa Fe) y 671.342 pollos (en dos granjas de parrilleros en Río Negro) (Ministerio de Economía, 2023). Si bien las exportaciones tuvieron serias restricciones, la recuperación del estatus generó la reapertura de la actividad.

Más del 90% de la producción aviar que se realiza en el país se destina al consumo interno. Según las estadísticas, la carne de pollo se ubicó en segundo lugar de preferencia en la mesa argentina, luego de la bovina. El consumo per cápita promedio de carne aviar en 2023 fue de 45,7 kg.habitante⁻¹.año⁻¹, y se encuentra en aumento (0,37% más respecto de 2022) (Ministerio de Economía, 2023).

1.2.- Producción del pollo parrillero

La producción de pollos parrilleros es versátil, dinámica y permite la obtención del producto en un corto período. Mejoras en genética, nutrición, sanidad y tecnología han dinamizado los procesos productivos (Kalmar *et al.*, 2013). Con ello, se ha logrado aumentar la velocidad de crecimiento de los pollos a través de los años. En 1945 se obtenían pollos con 2,3 kg de peso vivo a los cinco meses de edad. Para alcanzar 2,0 kg en 1980, el tiempo se redujo a 52 días. En el año 2000 se logró ese mismo peso a los 41 días y actualmente basta con 35 días en producción (Terra Celidonio, 2017).

La especie *Gallus gallus* subespecie *domesticus* se corresponde con las gallinas domésticas. El pollo parrillero es un híbrido (ABCD) que surge de cuatro líneas, lo que permite equilibrar parámetros productivos y económicos. Las líneas A y B son el resultado del mejoramiento de machos, y las líneas C y D de hembras. De esta manera, se requieren cuatro años para lograr el pollo parrillero desde el pedigrí.

Para realizar el mejoramiento genético, se enfatiza en los parámetros de conversión alimenticia, rendimiento de canal como pechuga y muslo, disminución de ascitis (acumulación de líquido en la cavidad abdominal) y anomalías esqueléticas (Terra Celidonio, 2017). La conversión alimenticia (kilogramos de alimento consumido para producir un kilogramo de carne) es importante dado que el 70% del costo total de producción se corresponde con el alimento de las aves (Thirumalaisamy *et al.*, 2016). Debido a la gran selección genética, lo que conduce a una elevada tasa de crecimiento y un alto rendimiento de pechuga, se produce un desequilibrio cardiopulmonar para oxigenar los músculos en desarrollo, lo que aumenta el riesgo de ascitis. Otra de las consecuencias del rápido crecimiento en tan corto tiempo, es la elevada incidencia de anomalías en patas y esqueleto inmaduro.

2.- TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS AVES

El tracto gastrointestinal (TGI) comprende cinco regiones bien diferenciadas en las cuales la microbiota va variando, debido a las condiciones particulares de cada región (O'Hara y Shanahan, 2006). Se pueden dividir dos grandes hábitats en el organismo de los pollos: macrohábitat (buche, proventrículo, molleja, intestino delgado - duodeno, yeyuno e íleon- e intestino grueso -ciego, colon y recto-) y microhábitat (comunidad dispersa en el lumen y comunidad adherida al mucus) (Vega *et al.*, 2022).

En el buche ocurre la hidrólisis de carbohidratos como el almidón, debido a una pequeña fermentación bacteriana. En el proventrículo, que es el estómago glandular, el alimento permanece poco tiempo y comienza la hidrólisis por secreción de ácidos y enzimas. Posteriormente, en la molleja, o estómago muscular, se produce la molienda del alimento y la mezcla con secreciones estomacales, donde hay mayor actividad de enzimas microbianas que aumentan la disponibilidad de nutrientes. El pH ácido de estas regiones (5,5 en buche y 2,5 - 3,5 en proventrículo y molleja) genera un ambiente de protección ante patógenos, que prefieren pH cercanos a la neutralidad. Estas condiciones favorecen la colonización de bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente *Lactobacillus* spp.

En cuanto al intestino delgado (ID), en duodeno hay presencia de compuestos antimicrobianos como las sales biliares, un elevado número de enzimas y alta concentración de oxígeno. El pH de esta porción del TGI es 5 - 6, generando condiciones desfavorables para los microorganismos. No obstante, posee mucus espeso que posibilita la colonización de una baja concentración de bacterias. En el yeyuno, donde ocurre la digestión propiamente dicha, el pH es 6,5 - 7 y proliferan especies como *Ruminococcus* spp., encargadas de la fermentación de carbohidratos estructurales. El íleon presenta un pH de 7 - 7,5, menor acción de enzimas, sales biliares y concentración de oxígeno. En esta sección hay mucus constante y mayor número de poblaciones de bacterias, especialmente de *Lactobacillus* spp. A su vez, pueden hallarse *Clostridium* spp. y Enterobacterias, cuya abundancia varía en función de la dieta del animal (Gabriel *et al.*, 2006; Olvera García y Leyva-Jiménez, 2020)

Los ciegos son dos cámaras de fermentación debido a la anaerobiosis y al mayor tiempo de permanencia del alimento en ellos. Aquí hay elevada producción de ácidos grasos de cadena corta y de vitaminas, absorción de algunos aminoácidos producidos por fermentación bacteriana y ciertas hexosas, y ocurre el aprovechamiento de una parte de los carbohidratos estructurales provenientes de la dieta (Stanley *et al.*, 2013).

En una misma porción del TGI, las comunidades de microorganismos se establecen adheridas al mucus o dispersas en el lumen. El microbioma disperso en el lumen toma contacto directo con las partículas del alimento, mientras que sus enzimas realizan la hidrólisis de compuestos para generar nutrientes benéficos para sí mismas, para el ave y para las bacterias que se adhieren al mucus. De allí surge la relevancia del accionar de cepas probióticas como *Bacillus* spp. y *Enterococcus* spp. Estas bacterias carecen de fimbrias y no se adhieren al epitelio. Además, realizan la hidrólisis de compuestos que serán fuente de nutrientes para otras bacterias benéficas. La multiplicación de patógenos como *Clostridium* spp. y *Salmonella* spp. puede inhibirse por la producción de bacteriocinas derivadas de las cepas probióticas antes mencionadas (Vega *et al.*, 2022).

2.1.- Microbiota intestinal

La microbiota es una comunidad compleja de microorganismos que habita el TGI de las aves de corral. Se trata de bacterias, hongos, protozoos y virus, que establecen una relación mutualista y sinérgica con el organismo huésped (Singh *et al.* 2013).

En diversos textos se considera la microbiota como un órgano olvidado (Pan y Yu, 2014; Vega *et al.*, 2022), ya que las mejoras genéticas han sido el foco de estudio sin considerar la relevancia de los microorganismos en la nutrición e inmunología del animal. Actualmente, se habla de la tríada microbiota intestinal - dieta - huésped (Abad *et al.*, 2017), a partir de la cual las mejoras mencionadas deben favorecer el sostenimiento de este equilibrio, para poder expresar todo su potencial.

2.1.1.- Funciones e importancia de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal (MI) tiene diversas funciones en el organismo de las aves. Por un lado, influye en el bienestar animal, ya que el 90% de la serotonina se produce en el intestino, gracias a la acción de metabolitos de la MI. Este es el órgano con la mayor cantidad de terminaciones nerviosas luego del cerebro. Por ello, el equilibrio del microbioma intestinal contribuye a la salud y productividad de las aves. En cuanto a las funciones fisiológicas, está implicada en la proliferación celular, el suministro de sangre y la generación de moco. Por otro lado, fortalece el sistema inmunológico, impidiendo el aumento de la permeabilidad intestinal e inflamaciones, por la mantención de las uniones estrechas (espacios intercelulares intestinales). Su influencia en el tejido linfoide asociado a la mucosa determina el 70% de la respuesta inmune de las aves. Además, previene el sobrecrecimiento de potenciales patógenos y la proliferación de agentes infecciosos (Olvera García y Leyva-Jiménez, 2020).

Adicionalmente, en lo que respecta a la nutrición, participa en el metabolismo de polisacáridos no amiláceos, mediante el cual se producen ácidos orgánicos y vitaminas que sirven como fuente de energía para el organismo de los pollos. También ejerce su influencia en la conexión de los sistemas digestivo, inmune, nervioso central y visceral.

La MI presenta acción antioxidante y aumenta el número de inmunoglobulinas A y de linfocitos B. Por otro lado, está involucrada en funciones tróficas de proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, en el desarrollo y modulación del sistema inmune, reducción de la inflamación intestinal y reducción de proteínas relacionadas con la apoptosis (Vega *et al.*, 2022).

2.1.2.- Mecanismos de colonización de la microbiota intestinal

La exclusión competitiva es el mecanismo por el cual la MI coloniza los espacios de las células del intestino y sus sitios de acoplamiento, impidiendo que se asienten patógenos como *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Es decir, forma una barrera protectora de recubrimiento para el intestino. La secreción de bacteriocinas por parte de la MI es otro mecanismo de exclusión competitiva. Estas sustancias incluyen compuestos inhibitorios naturales, ácidos orgánicos y ácidos

grasos volátiles. Por modificación del ambiente entérico, generan inhibición del desarrollo de microorganismos perjudiciales (La Ragione *et al.*, 2000).

Como mecanismo de colonización indirecto de la MI se encuentra la producción de mucina, que se ve estimulada por los microorganismos benéficos. La mucina está compuesta por proteínas de alto peso molecular que se hallan en el moco intestinal, pulmonar y genital. Entre las funciones que cumple se puede mencionar el refuerzo de la barrera que crea la mucosa intestinal reteniendo material perjudicial, al mismo tiempo que modula el metabolismo, el proceso de maduración celular y la expresión de ciertos genes, como los implicados en la absorción de nutrientes (Zocco *et al.*, 2007). Existen las mucinas de membrana, que están más cercanas a la microbiota y forman una barrera protectora adicional, y las secretadas al espacio intestinal, que son las formadoras de moco.

El moco del intestino brinda protección contra lesiones físicas, sobrecrecimiento microbiano y proliferación de patógenos. Cuando ocurren patologías intestinales y cáncer, se restringen las propiedades del moco, porque resulta muy permeable y prácticamente inexistente, lo que beneficia a las bacterias perjudiciales que generan inflamación y daños. En estos casos, las mucinas de membrana recobran importancia por su carácter de barrera (Vega *et al.*, 2022)

2.1.3.- Colonización progresiva de la microbiota del tracto gastrointestinal en pollos parrilleros

Diversos factores determinan la cantidad y composición del microbioma entérico, como el ambiente, la dieta, la sección intestinal y la edad de los pollos. El sistema de crianza es particularmente uno de los factores preponderantes en la colonización y establecimiento de la ecobiota de los pollitos. La cría a campo o en sistemas extensivos estimula la colonización espontánea de la microbiota del entorno y favorece una simbiosis benéfica. Por el contrario, en sistemas intensivos disminuye la posibilidad de adquisición de microorganismos autóctonos naturales, aumentando el riesgo de colonización patógena, principalmente por *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, lo cual resulta en la síntesis de compuestos tóxicos o perjudiciales, inflamaciones o infecciones.

En el TGI de los pollos recién nacidos, la microbiota se instala por transmisión materna desde el oviducto y desde el medio circundante por los poros de la cáscara del huevo. Luego de la eclosión, la exposición a los microorganismos de la incubadora, el manejo, la vacunación y el transporte son inoculantes de la microbiota intestinal. Los pollitos pueden exponerse a múltiples patógenos, pero los anticuerpos maternos de la yema (IgY) pueden activar el sistema inmune y brindarles protección (Mahmood y Guo, 2020).

Al día siguiente de su nacimiento, las bacterias colonizan el íleon y los ciegos. Pasados tres días, en ID e intestino grueso, se incrementa diez veces la abundancia de bacterias. En ID la microbiota se estabiliza a las dos semanas de vida y evoluciona a medida que el ave crece. Los Lactobacilos resultan el grupo dominante, y ocasionalmente pueden hallarse Clostridios, *E. coli*, Eubacterias, Enterococos, Fusobacterias y Propionibacterias (La Ragione *et al.*, 2005).

El intestino madura rápidamente durante la primera semana de vida. En este proceso, las vellosidades intestinales logran el 50% de la elongación que deberán alcanzar en el estado adulto. Entre los grupos bacterianos presentes se distinguen *Clostridium* spp., Lactobacilos, Proteobacterias y *Ruminococcus* spp. Dentro de las Proteobacterias se encuentran los patógenos Gram negativos *E. coli* y *Salmonella* spp. Dado que en esta etapa el intestino es aún inmaduro, la MI no se encuentra estable y la respuesta inmunológica puede ser ineficiente (Lan *et al.*, 2005). Luego, la microbiota progresa hacia los ciegos, donde se establece y se diferencia transcurridos los primeros siete días de vida.

A las dos semanas de vida del pollito, ya se han diferenciado las condiciones de anaerobiosis, pH, ácidos grasos de cadena corta del metabolismo microbiano, surfactantes. Esto marca la diferenciación espacial de los microorganismos a través del sistema digestivo del pollo. A los 21 días predominan *Clostridium* spp. en ciego y Lactobacilos en íleon, que se encuentran incrementando su población mientras disminuye la de especies clostridiales (Abad *et al.*, 2017). Al mes de vida, la microbiota cecal se encuentra establecida.

Con alimento de buena calidad y un manejo óptimo se puede reducir el período de establecimiento del microbioma. El TGI de los pollos adultos puede alojar entre 400 y 500 especies bacterianas y alrededor de 10^{13} microorganismos en total, que viven en equilibrio (Johansen *et al.*, 2006; Lakhan y Kirchgessner, 2010). Una microbiota balanceada está compuesta por bacterias intestinales benéficas en un 90% o más (flora benéfica, con predominancia de bacterias ácido lácticas), una flora satélite menor al 1% (*E. coli* y Enterococos), y menos de 0,01 % de patógenas (flora residual, compuesta por *Clostridium spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Candida sp.*). Este estado de equilibrio se denomina eubiótico (PlusVet, 2022). Para corroborarlo, durante la crianza de los pollos, se debe prestar especial atención a la calidad de las heces; si estas son consistentes y sin humedad, se relacionan a un estado balanceado de la microbiota. En caso contrario, podría estar ocurriendo una disbiosis o disbacteriosis. La disbiosis representa los cambios producidos en las poblaciones bacterianas del ID y ciego durante un desequilibrio. Si esta situación perdura en el tiempo, resultaría en efectos negativos para el hospedador (Vega *et al.*, 2022).

Existen múltiples causas que pueden conducir a una disbiosis. Entre ellas, se pueden mencionar el estrés, la ocurrencia de coccidiosis, enfermedades bacterianas o virales, cambios en la alimentación. Los síntomas de disbiosis suelen caracterizarse por adelgazamiento de la pared intestinal y contenidos intestinales acuosos y gaseosos. Además, este estado predispone a la deficiencia de absorción de nutrientes en el intestino, resultando en menor conversión alimenticia y disminución del peso vivo (PlusVet, 2022).

2.1.4.- Impacto de la dieta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal

El alimento proporcionado en la dieta es el sustrato del cual dispone la microbiota. Debido a ello, los microorganismos presentes en el TGI dependen de forma directa del alimento tanto por su composición, como por su forma de administración.

Los sistemas de crianza intensivos en confinamiento a los que están sometidos los pollos parrilleros son predisponentes a factores de estrés (Londero, 2012). Como consecuencia, en las últimas décadas se han empleado antibióticos a modo de

suplemento o como promotores de crecimiento. Estos compuestos se han utilizado para estabilizar la microbiota intestinal, mejorar parámetros productivos y prevenir enfermedades.

A raíz de la aparición y propagación de bacterias resistentes a antibióticos en la carne, se cuestionó el uso de tales sustancias. Además, cabe destacar que los antibióticos no distinguen entre microorganismos patógenos y benéficos en su acción de control, originando desequilibrios en la microbiota gastrointestinal (Huyghebaert *et al.*, 2011; Král *et al.*, 2012). Otro motivo de su potencial peligrosidad es la residualidad que se transmite a los tejidos animales destinados al consumo humano. Tal es así, que la Unión Europea prohibió totalmente el uso de antibióticos promotores de crecimiento en alimentación animal desde el año 2006 (Gaggia *et al.*, 2010).

Las patologías entéricas tienen gran relevancia en la industria avícola, ya que incrementan la mortalidad y generan pérdidas a nivel productivo. Además, pueden contaminar los productos destinados a consumo humano generando enfermedades de transmisión alimentaria. Por estas razones y lo mencionado anteriormente respecto de la residualidad y peligrosidad de los antibióticos, es que la búsqueda de nuevos compuestos como aditivos naturales, probióticos, prebióticos y compuestos nutracéuticos, se estudian como alternativa para mejorar el crecimiento, la eficiencia y la salud de los pollos parrilleros en producción (Blajman *et al.*, 2015).

3.- Polen apícola como complemento en la dieta de pollos parrilleros. Una propuesta novedosa.

Argentina posee un extenso territorio apto para el desarrollo de la apicultura. Su potencial productivo incluye la obtención de miel y de otros productos de la colmena. Se trata del país con mayor cantidad de colmenas del hemisferio sur, con un número estimativo de 28.600 apicultores que explotan 2,5 millones de colmenas (García Paoloni, 2021).

Si bien la miel es el producto que posiciona a Argentina como uno de los líderes en producción y exportación a nivel mundial, la producción de polen apícola (PA)

también es importante, ya que el país ocupa el segundo lugar como productor (Lorini *et al.*, 2020). Cabe mencionar que existen zonas de gran tradición polinífera en el país (Cardín, 2018), como así también, un gran potencial para la diversificación y diferenciación de productos de la colmena y para el agregado de valor (Fernández *et al.*, 2017).

Para comenzar a hablar del PA es importante en primera instancia, conocer su definición ya que hay una gran diferencia con lo que significa el polen floral o vegetal. El polen vegetal es un conjunto de células que corresponden al gameto masculino o anterozoide de las Espermatófitas, indispensable para realizar la fecundación de los óvulos que generarán las semillas (estructuras responsables de la perpetuidad de la especie) (Fernández *et al.*, 2017). Para lograr la fecundación del gameto femenino, uno de los mecanismos de polinización es la entomofilia. La abeja *Apis mellifera* L. es, entre otros insectos, transportadora del polen en este proceso. Este himenóptero recolecta cientos de granos de polen de la flor mediante una diferencia de cargas (positiva en la flor y negativa en la abeja). En la colmena, el polen floral representa la única fuente de proteínas, sustancias grasas, minerales y vitaminas, necesarios para la producción de alimento para las larvas y las abejas jóvenes.

Luego de la recolección de los granos de polen, la abeja los cepilla, humedece con el néctar del buche melario y los adhiere. Seguidamente, los comprime y transporta en la corbícula del tercer par de patas. De esta manera, se conforma el polen corbicular. Al llegar a la colmena, depositan el polen en las celdas del panal, lo empaquetan y le agregan compuestos de las glándulas salivales, como enzimas digestivas, ácidos orgánicos y miel. El resultado de este producto se denomina polen apícola (PA). Este, debido a condiciones de anaerobiosis y por la presencia de *Lactobacillus* spp., está sometido a un proceso de fermentación láctica. Este “ensilado” dentro del panal transforma el polen corbicular traído del campo en lo que se denomina “pan de polen”, que aumenta su valor nutritivo y la digestibilidad debido a la acción microbiana (García Paoloni, 2021). Asimismo, la presencia de ácido láctico producto del proceso fermentativo permite su conservación. Una vez cosechado de la colmena, el PA se seca

para reducir su humedad, se limpia y se acondiciona para su almacenaje. Posteriormente, debe mantenerse refrigerado hasta su utilización.

La composición del PA varía según el origen botánico, ubicación geográfica, estacionalidad y factores climáticos (Soares de Arruda *et al.*, 2020). Además, influye la recolección, tratamientos poscosecha y método de conservación (Bogdanov, 2014). Ares *et al.* (2018), han caracterizado al PA como el único alimento perfectamente completo. En general, el PA incluye carbohidratos, compuestos nitrogenados (proteínas y aminoácidos esenciales como prolina, lisina, leucina, ácido glutámico y aspártico), lípidos y, en menor proporción, vitaminas (principalmente del complejo B) y minerales (Thakur y Nanda, 2020). Según la especie botánica de la cual se origina, puede contener ácido fólico, biotina, pro-vitamina A, vitamina C, vitamina E (Bogdanov, 2004; Nogueira *et al.*, 2012).

Otros componentes presentes en el PA de importancia por ser los principales con función biológica son los flavonoides y los fitoesteroles. Los flavonoides tienen capacidad antiateroesclerótica, anticarcinógena, antienvjecimiento, antiinflamatoria y antioxidante. También, tienen propiedades mejoradoras de la función endotelial. Diferentes flavonoides demostraron ser antibióticos, como los aislados de polen apícola de *Eucalyptus globulus* frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Bogdanov, 2017). Otros son efectivos contra bacterias fitopatógenas (Basim *et al.*, 2006). La acción terapéutica de valor clínico más destacada es el efecto profiláctico y curativo que ejercen preparaciones comerciales con polen vegetal en desórdenes prostáticos, aunque se han encontrado resultados positivos con PA (Comisión Europea, 2006; Formicki *et al.*, 2013).

Los fitoesteroles colaboran en la inhibición parcial de la absorción del colesterol a nivel intestinal, disminuyendo el colesterol en sangre; siendo esta su actividad biológica más destacada. Presentan acción antiinflamatoria e inmunoestimulante, además de capacidad antianémica, antiosteoporosis y antialérgica. Además, hay evidencia acerca de la acción de los esteroides vegetales contra el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como el colorectal, de mama y de próstata (Mărgăoan *et al.*, 2010; Bogdanov, 2014).

El polen se ha convertido en un importante componente de la alimentación animal, sobre todo, como fuente excepcional de proteínas y buen sustituto de los antibióticos (Abdelnour *et al.*, 2019). Por otro lado, Wang *et al.* (2007) demostraron que los pollos alimentados con PA, presentaron un mejor desarrollo de las vellosidades a lo largo del ID (duodeno, yeyuno e íleon). Estos hallazgos sugieren que el PA podría promover el desarrollo temprano del sistema digestivo. Además, los estudios realizados por Kročko *et al.* (2012), revelaron la capacidad del PA y del propóleo para mejorar el patrón de colonización microbiana del TGI, cuando fueron suplementados en la dieta de pollos. La actividad antimicrobiana de los productos de la colmena es ampliamente reconocida (Kostić *et al.*, 2020). La suplementación de extractos etanólicos de PA en la dieta de pollos, se encontró un incremento significativo del número de *Lactobacillus* spp. y Enterococos en el ciego; evidenciando la potencial actividad prebiótica del PA (Miroslava *et al.*, 2013; Kacaniova *et al.*, 2013). Asimismo, el PA tiene el potencial de mejorar el sistema inmunológico porque posee un marcado perfil de micronutrientes (Popiela-Pleban *et al.*, 2012). En conejos, se comprobó el efecto inmunomodulador del PA como complemento en la dieta durante un mes, porque aumentó la respuesta inmune humoral y el cambio en la reacción de hipersensibilidad retardada (Dudov *et al.*, 1994). Fazayeli-Rad *et al.* (2015), han confirmado que el PA como complemento en la dieta de pollos de engorde es un recurso interesante, capaz de mejorar el rendimiento productivo y el estado inmunológico.

Por lo tanto, considerando los beneficios observados en los productos de la colmena, esta tesis propone el uso del PA como complemento en la dieta de pollos parrilleros y su efecto sobre la dinámica de la microbiota en las excretas y el intestino delgado.

3.- HIPÓTESIS

El uso de polen apícola como complemento en la dieta de pollos parrilleros mejora la ecobiota intestinal, optimizando la calidad de las excretas crudas.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General

- Investigar el efecto del polen apícola como complemento en la dieta de pollos parrilleros sobre la dinámica de los grupos microbianos presentes en el ID y en las excretas crudas.

4.2.- Objetivos Específicos

- Cuantificar grupos microbianos en excretas crudas e ID, como bacterias aerobias mesófilas (RHP), hongos y levaduras (HL), bacterias ácido lácticas (BAL) y coliformes totales (CT) y fecales (CF), durante diferentes instancias de la crianza de pollos, en los distintos tratamientos experimentales.
- Estudiar el efecto del agregado de polen apícola sobre la dinámica microbiana presente en excretas crudas a lo largo del proceso de crianza de pollos parrilleros.
- Investigar el efecto del agregado de polen apícola sobre los grupos microbianos presentes en el intestino delgado, y su efecto sobre el pH del contenido intestinal.
- Determinar presencia / ausencia de *Salmonella* spp. en excretas crudas e ID.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Lugar de trabajo

El ensayo se realizó en la Unidad de Experimentación Avícola (UEA) del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca (38° 41' Lat. S y 62° 15' Long. O).

5.2.- Instalaciones

La UEA es un galpón cerrado, equipado con calefacción mediante estufas eléctricas, aire acondicionado, ventilación forzada e iluminación artificial. Estas características permiten regular y mantener las condiciones adecuadas requeridas por los pollos en función de su edad.

Además, consta de una sala donde se preparan las dietas y otra en la que se realiza la etapa de cría de las aves. La sala de crianza cuenta con 30 corrales construidos con madera y alambre hexagonal, que son desmontables y se distribuyen longitudinalmente en dos hileras, con un pasillo intermedio (**Figura 1**). Los corrales tienen una dimensión de 1 m x 1 m x 0,6 m, y se encuentran elevados a 0,30 m del piso, sobre soportes de madera tipo slat. Los listones de madera que conforman la base están recubiertos por una malla plástica cuadrículada, lo que favorece la separación de los animales de la materia fecal y la circulación normal dentro de los corrales.

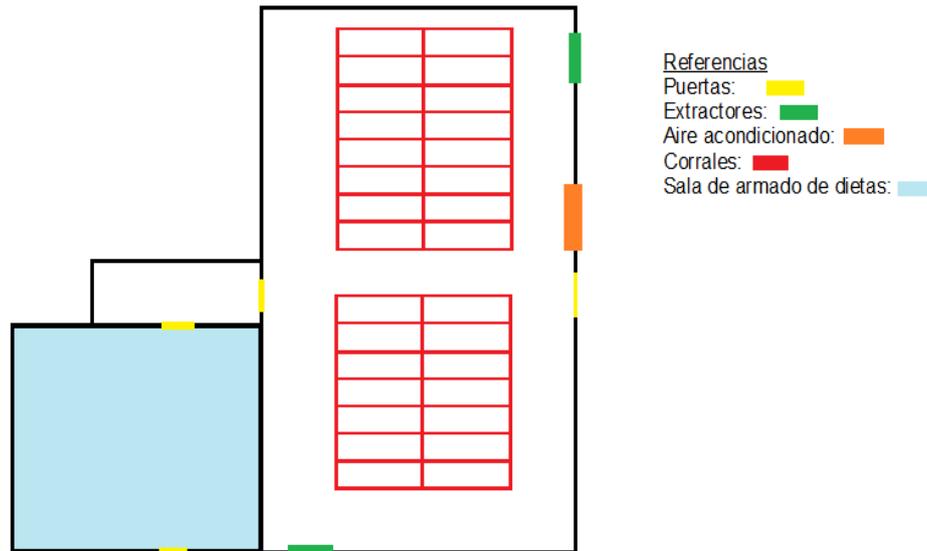


Figura 1. Distribución espacial del acceso, implementos, corrales y sala de armado de dietas en la UEA, UNS (Savy, 2019).

5.3.- Animales y manejo

Se evaluaron 72 machos línea Cobb®, adquiridos en un criadero comercial de la ciudad de Bahía Blanca. La crianza de los animales tuvo una duración de 43 días. Los primeros 21 días de vida se incorporaron los pollitos BB en un solo corral de 2 x 2 m, con la modificación que han permitido las estructuras desmontables. Debajo de los corrales se colocaron paños de nylon para recolección y descarte de heces. Estos se cambiaron diariamente para mantener las condiciones de higiene y asegurar el bienestar de las aves.

El agua se suministró en bebederos de depósito invertido, de cuatro litros de capacidad, asegurándose diariamente la provisión de agua constante. El alimento se proveyó *ad libitum* en comederos tipo canaleta de un metro de longitud, asignado diariamente según la dieta correspondiente. El manejo de la temperatura se realizó a lo largo de toda la crianza a través de lámparas infrarrojas de 250 W, estufas y un aire acondicionado frío-calor.

La regulación fue variable en función de la edad de las aves, como se detalla a continuación: primera semana 32 °C, con disminución semanal de 3 °C hasta alcanzar 19 °C. El monitoreo de temperaturas máximas y mínimas se realizó durante la mañana

y la tarde, mediante la lectura de dos termómetros en distintos puntos del recinto. El plan de iluminación fue de 24 h de luz, con tubos fluorescentes de 52 W.

El día 22 del ensayo, las aves fueron pesadas y distribuidas al azar en tres tratamientos en función de la dieta asignada a cada uno de ellos. A su vez, se colocó en una pata de cada ave un precinto de goma eva numerado y con un color distintivo para cada tratamiento, para mantener la individualidad de cada animal a lo largo del ensayo. En esta instancia, cada corral tuvo un comedero canaleta de un metro de largo y dos bebederos automáticos tipo nipple.

5.4.- Plan sanitario

Durante los primeros cuatro días, se suministró en el agua de bebida enrofloxacin (antimicrobiano sintético de amplio espectro, a razón de 1 mm.l⁻¹) y un polivitamínico (1 g.l⁻¹). A los siete días de edad se realizó una vacunación preventiva contra Newcastle y Bronquitis Infecciosa por vía ocular. El día 14, se incorporó en el agua de bebida la dosis correspondiente para prevención contra Gumboro.

Las observaciones generales de comportamiento y la mortalidad, fueron registradas diariamente durante todo el período experimental. Las prácticas de manejo y los protocolos experimentales respetaron las normas de bioseguridad establecidas por la Universidad Nacional del Sur, que se adhieren a las establecidas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria para la crianza de pollos parrilleros (INTA, 2016).

5.5.- Dietas experimentales

Durante los primeros 21 días de vida los pollitos fueron alimentados con una dieta iniciadora, común a todos los animales (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ingredientes y composición química de la dieta iniciadora, suministrada hasta los 21 días de vida.

INICIADOR	
Ingredientes (%)	
Maíz	57,0
Expeller de soja	39,0
Fosfato bicálcico	1,00
Conchilla	2,00
DL-metionina	0,20
Lisina HCL	0,10
Sal	0,20
Núcleo vitamínico mineral ¹	0,50
Composición química	
PB (%)	21,89
EM (Kcal.kg ⁻¹)	3178
Calcio (%)	0,959
Fósforo total (%)	0,459
Metionina + Cistina (%)	0,853
Lisina (%)	1,151
Lípidos (%)	5,446
Fibra (%)	2,9613

¹Vitamina A: 8.000.000 UI; vitamina D3: 500.000 UI; vitamina E: 30.000 UI; vitamina B2: 3.800 mg; vitamina B6: 1.800 mg; vitamina B1: 1.200 mg; vitamina K3: 1.500 mg; ácido nicotínico: 26.000 mg; ácido pantoténico: 9.000 mg; ácido fólico: 600 mg; biotina: 40 mg; colina: 180 g; vitamina B12: 10.000 µg; cobre 8.500 mg; hierro 50.000 mg; iodo: 1.000 mg; manganeso: 70.000 mg; selenio: 250 mg; cobalto: 200 mg; zinc: 60.000 mg; antioxidante 125 mg; excipiente C.S.P.: 1.000 g.

El día 22 se pesaron y se dividieron las aves en 3 tratamientos al azar, formando 24 grupos con tres animales cada uno, obteniendo ocho repeticiones para cada tratamiento. Los tratamientos se diferenciaron en la presencia y cantidad de PA adicionado en la dieta, como se detalla a continuación:

C: CONTROL (sin adicionado de polen)

PI: POLEN I (1% de PA)

PII: POLEN II (2% de PA)

Hasta el día 43 de crianza, los pollos recibieron las dietas experimentales mencionadas anteriormente, las cuales fueron isoproteicas e isoenergéticas (**Tabla 2**).

Tabla 2. Ingredientes y composición química de la dieta terminadora, suministrada desde el día 22 al 43.

TERMINADOR	C	PI	PII
Ingredientes (%)			
Maíz	61,00	61,00	61,00
Polen apícola	-	1,00	2,00
Expeller de soja	34,48	34,48	34,48
Conchilla	1,00	1,00	1,00
Fosfato bicálcico	2,30	2,30	2,30
DL-Met	0,30	0,30	0,30
Lisina	0,22	0,22	0,22
Sal	0,20	0,20	0,20
Núcleo vitamínico ² mineral	0,50	0,50	0,50
Composición química			
PB (%)			19,42
EM (Kcal.kg ⁻¹)			3157
Calcio (%)			1,02
Fósforo total (%)			0,51
Metionina + Cistina (%)			0,92
Lisina (%)			1,17
Lípidos (%)			5,25
Fibra (%)			2,78

C: Control; PI: dieta con 1% de polen apícola; PII: dieta con 2% de polen apícola.

² Vitamina A: 8.000.000 UI; vitamina D3: 500.000 UI; vitamina E: 30.000 UI; vitamina B2: 3.800 mg; vitamina B6: 1.800 mg; vitamina B1: 1.200 mg; vitamina K3: 1.500 mg; ácido nicotínico: 26.000 mg; ácido pantoténico: 9.000 mg; ácido fólico: 600 mg; biotina: 40 mg; colina: 180 g; vitamina B12: 10.000 µg; cobre 8.500 mg; hierro 50.000 mg; iodo: 1.000 mg; manganeso: 70.000 mg; selenio: 250 mg; cobalto: 200 mg; zinc: 60.000 mg; antioxidante 125 mg; excipiente C.S.P.: 1.000 g.

Para todos los tratamientos, se proveyó alimento y agua *ad libitum* durante todo el ensayo, asegurando un rechazo del 10%. La preparación de todas las dietas se realizó con mezcladora "Marion Mixer", fabricada por "Rapids Machinery Company" - Marion, Iowa (EEUU). El análisis del agua de bebida reveló la potabilidad e inocuidad para ser utilizada, según APHA (1992).

El PA suministrado tuvo composición predominante de flor amarilla (*Diplotaxis tenuifolia* L.), y fue adquirido de un apiario comercial de la ciudad de Bahía Blanca. El contenido de proteína bruta (PB) de dicho producto se determinó según el procedimiento de Kjeldahl (AOAC, 2000) y presentó un 27,43% de PB.

5.6.- Faena

A los 43 días de edad, ocho animales por tratamiento (1 macho/corral) elegidos al azar fueron pesados, insensibilizados manualmente como protocolo de bienestar animal, sacrificados y desangrados a través del corte de la vena yugular, luego de un ayuno de 12 horas. Seguidamente, fueron escaldados, pelados y eviscerados. Los ID fueron apartados y conservados en freezer a -18 °C, para su posterior análisis microbiológico.

5.7.- Muestreo de heces e ID

La recolección de heces se realizó ascépticamente con bandejas plásticas de 20 cm x 30 cm, que se colocaron debajo de cada corral. Además, se ubicaron los recipientes de muestreo estratégicamente, evitando el contacto con alimento desperdiciado y heces de otros corrales. La disposición de los corrales a 30 cm del suelo facilitó la colocación de las bandejas estériles. El periodo de recolección fue de 24 horas. Una vez retiradas las bandejas, se volcaron las excretas en una bolsa debidamente rotulada con fecha, tratamiento y peso de la muestra. Las muestras fueron conservadas en freezer a -18 °C, hasta su posterior utilización para las determinaciones microbiológicas.

Durante la crianza, las muestras de excretas se recolectaron en tres momentos particulares. Las primeras muestras se recogieron el día 21 (consumo de dieta iniciadora; In), luego el día 28 (primera semana de consumidas las dietas experimentales; C₂₈, PI₂₈, PII₂₈) y las terceras muestras, el día 42 (previo a faena; C₄₂, PI₄₂, PII₄₂). Las recolectadas los días 28 y 42, se dividieron en los distintos tratamientos llevados a cabo en el ensayo: Control, Polen I y Polen II. Para cada tratamiento se recolectaron ocho muestras simples que conformaron una muestra compleja.

Para el análisis microbiológico de los intestinos delgados, se tomó de cada animal faenado la porción media del ID (yeyuno) sin contenido. Además, se extrajo el contenido de cada ID para medir el correspondiente pH.

5.8.- Procesamiento de muestras

Del total de heces recolectadas en cada tratamiento, se pesaron 25 gramos para incorporar a un frasco con 225 ml de agua peptonada bufferada (APB Britania[®]), obteniendo una dilución de la muestra original (10^{-1}). Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento. Del mismo modo, se procedió a realizar la dilución correspondiente para la porción media de ID, el cual fue triturado antes de introducirlo en APB.

El APB es un medio de cultivo no selectivo de preenriquecimiento de microorganismos, que mantiene un pH alto y anula los efectos del daño celular que pueden ocurrir a pH ácido.

5.9.- Determinaciones microbiológicas

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Se dispuso de espacio y material para trabajar bajo condiciones de esterilidad garantizadas, como cabinas de bioseguridad tipo I y II, donde se manipularon las muestras y los medios de cultivo. También, se dispuso de estufas de cultivo y elementos de protección personal.

Los medios específicos para cada determinación fueron preparados a su concentración correspondiente con agua destilada (AD). Luego de la preparación, se esterilizaron en autoclave de Chamberland ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 1 atm por 15 minutos).

Tanto en excretas como en intestino delgado, se realizaron las siguientes determinaciones microbiológicas:

- Recuento heterotrófico en placa (RHP)
- Hongos y levaduras (HL)
- Bacterias ácido lácticas (BAL)
- Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF)
- Presencia o ausencia de *Salmonella* sp.

Por el método de diluciones seriadas, se obtuvieron cinco diluciones (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) a partir de la muestra original diluida (10^{-1}) en APB.

5.9.1.- Recuento heterotrófico en placa (RHP)

A partir de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , se tomó una alícuota de 0,1 ml y se sembraron cajas de Petri descartables con medio agar nutritivo (AN Britania[®]), por diseminación con espátula de Drigalsky. El AN es un medio de cultivo sólido, no selectivo, empleado para aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. Tiene en su composición pluripeptona y extracto de carne, que constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aporte de nutrientes para el desarrollo bacteriano.

Las réplicas se realizaron por duplicado para cada dilución. Una vez sembradas las placas, se llevaron a incubar en estufa por 48 horas a 37 °C. Luego de la incubación, se realizó el conteo de UFC RHP.g⁻¹ de muestra.

5.9.2.- Hongos y levaduras (HL)

Se utilizó medio sólido y selectivo para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras. Hongos y Levaduras Medio (HL Britania[®]) es nutritivo porque tiene extracto de levadura y glucosa, y selectivo por la presencia de cloranfenicol que inhibe el crecimiento bacteriano.

Para la determinación, se usaron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se realizó la siembra por diseminación en las placas de Petri. Se hicieron dos repeticiones para cada dilución. La incubación se hizo en estufa durante 48 horas a 28 °C. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se contaron las UFC HL.g⁻¹ de muestra.

5.9.3.- Bacterias ácido lácticas (BAL)

El medio de cultivo empleado para el aislamiento y recuento de bacterias ácido lácticas fue M.R.S. Agar (Britania[®]). Se trata de un medio selectivo porque contiene citrato de amonio, que actúa como agente inhibidor del crecimiento de bacterias Gram negativas. Además, es sólido y enriquecido con monooleato de sorbitán, sales de sodio, magnesio y manganeso, que proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos.

Con las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} se realizó la siembra por duplicado, por diseminación en las placas de Petri. Éstas se introdujeron en una jarra anaeróbica (Gaspac[®]) en la

que se colocaron sobres productores de anaerobiosis (Anaerogel Thermo Cientific®) e indicadores que aseguraran estas condiciones (Thermo Cientific®). La incubación se realizó en estufa a 28 °C durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de UFC BAL.g⁻¹ de muestra.

5.9.4.- Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF)

Esta determinación se realizó en tubos de ensayo con caldo Mac Conkey. Este caldo es un medio de cultivo selectivo, que tiene peptona como fuente de aminoácidos y de otros factores de crecimiento, lactosa como hidrato de carbono fermentable y bilis de buey como estimulante del crecimiento de las bacterias coliformes e inhibidor de gran parte de la flora Gram positiva. Además, tiene púrpura de bromocresol, que es indicador de pH. Debido a que los coliformes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, al acidificarse el medio se produce viraje del indicador de pH, de color púrpura a amarillo.

Los tubos de ensayo con 10 ml de caldo Mac Conkey y campana Durham invertida se sembraron con la muestra original diluida (10⁻²). Las alícuotas utilizadas fueron 1 ml, 0,1 ml y 0,01 ml. Se hicieron tres tubos por alícuota, por triplicado. Se incubó la batería de tubos ubicados en gradilla, en estufa a 37 °C durante 48 horas. Con los tubos positivos se determinó el número más probable (NMP) de coliformes totales en 100 gramos de muestra, mediante el uso de tablas.

Para coliformes fecales, los tubos positivos que evidenciaron cambio de color del medio y formación de gas en la campana se repicaron en nuevos tubos con caldo Mac Conkey con un ansa de siembra. El ansa estéril, llevada a incineración en mechero de gas, se introdujo en el tubo positivo y se transfirió al nuevo tubo con caldo Mac Conkey estéril. La incubación se realizó en estufa durante 48 horas a 44,5 °C. Con los tubos que resultaron positivos en esta nueva etapa se obtuvo el NMP de coliformes fecales en 100 gramos de muestra, mediante el uso de tablas.

5.9.5.- *Salmonella* spp.

La detección de *Salmonella* spp. se efectuó según protocolos de ANLIS, Instituto Nacional de Microbiología Dr. Malbrán, Buenos Aires.

5.10.- Medición de pH intestinal

El pH se midió sobre un homogeneizado de 0,8 g de contenido intestinal de yeyuno, junto con 10 ml de agua destilada. El instrumental empleado fue un termo-pHmetro (Altronix[®]) con electrodo combinado, calibrado con patrones de pH 4,0 y 7,0.

5.11.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos se registraron y se analizaron mediante ANOVA completo al azar, con el programa estadístico InfoStat versión 2020. La comparación entre valores medios se realizó con el test de Diferencias Mínimas Significativas de Fisher.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Efecto de la dieta sobre los parámetros microbiológicos de excretas crudas

Tabla 3. Parámetros microbiológicos en excretas crudas de pollos parrilleros en distintos estadios de crianza y alimentados con dietas diferenciales.

Etapa		RHP	HL	BAL	CT	CF
21 días (In)						
		8,32	6,05	6,77	4,04	4,04
28 días						
	C ₂₈	7,94 c	6,34 c	6,35 a	4,02	4,02
	PI ₂₈	7,40 b	3,62 a	6,72 b	4,10	4,10
	PII ₂₈	6,85 a	5,47 b	6,86 b	4,10	4,10
P =		< 0,0001	< 0,0001	= 0,0001	sd	sd
EE		0,0477	0,0282	0,0127		
42 días						
	C ₄₂	7,71 a	6,33 a	6,83 a	4,02	4,02
	PI ₄₂	8,03 a	6,68 b	7,09 b	4,10	4,10
	PII ₄₂	7,83 a	6,96 c	7,23 b	4,10	4,10
P =		= 0,4490	< 0,0001	= 0,001	sd	sd
EE		0,0898	0,0047	0,0117		

C: Control (dieta basal); PI: dieta basal con 1% de polen apícola; PII: dieta basal con 2% de polen apícola. 21, 28 y 42 días: fechas de muestreo de excretas. RHP: bacterias aerobias mesófilas; HL: hongos y levaduras; BAL: bacterias ácido lácticas; CT: coliformes totales; CF: coliformes fecales. Resultados expresados como log₁₀ UFC.g⁻¹ de excretas. Letras distintas indican diferencias significativas. EE: error estándar.

En la **Tabla 3** no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las variables CT y CF para los distintos tratamientos en el muestreo a los 28 días. El mismo resultado fue observado a los 42 días. Estudios realizados por Donoso (2014) demostraron el mismo comportamiento para el grupo coliformes frente al uso de un formulado probiótico.

6.1.1.- Recuento heterotrófico en placa

En cuanto a los valores de RHP, el muestreo a los 21 días se considera como condición inicial de la salud intestinal de los animales bajo la dieta iniciadora. A los 28 días, los tratamientos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$), observándose el valor mayor de RHP en C₂₈ y el menor en PII₂₈. No obstante, a los 42 días, no se encontraron diferencias significativas entre las dietas experimentales.

El comportamiento observado a los 28 días, podría deberse a que los microorganismos anaerobios facultativos contribuyen a los cambios ambientales en el TGI (La Ragione *et al.*, 2005). Además, este grupo fisiológico es formador de esporas, lo que podría explicar el menor recuento observado en las dietas experimentales.

6.1.2.- Hongos y Levaduras

En la **Tabla 3** puede apreciarse que para In se determinó un valor medio de HL de 6,05 log UFC.g⁻¹ tomando este dato como referencia inicial para todas las aves. A los 28 días se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$), observándose que las excretas provenientes de las dietas que contenían PA disminuyeron las UFC de HL. Sin embargo, a los 42 días, se observó un efecto contrario. El agregado de polen apícola produjo un incremento en la población eucariótica de HL al final de la crianza. Este grupo fisiológico posee una importante capacidad competitiva natural, fundamentalmente debido a la presencia de mananos y glucomananos en su pared celular. Similares resultados fueron obtenidos en la UEA por Couto (2019), Bichara (2019) y Lanaro (2019), utilizando distintos aditivos en la dieta de pollos parrilleros.

Durante el primer mes de vida de los animales, se observó una disminución de los valores de RHP y HL para todos los tratamientos. Estos resultados podrían estar asociados a que en esta etapa las aves se encuentran adquiriendo la microbiota intestinal. Resultados similares fueron obtenidos por Donoso (2014) en pollos parrilleros, cuando fueron incorporadas distintas concentraciones de probióticos en el agua de bebida.

6.1.3.- Bacterias ácido lácticas

En la **Tabla 3** puede observarse que el conteo In en BAL alcanzó un valor de 6,77 log UFC.g⁻¹. A los 28 días, PI₂₈ y PII₂₈ mostraron mayores conteos de UFC de BAL respecto de C₂₈ ($p = 0,0001$). Cabe destacar que, a los 42 días, la dinámica de BAL mantuvo la

tendencia observada a los 28 días, evidenciándose incrementos altamente significativos ($p = 0,001$) en los valores de PI_{42} y PII_{42} , con respecto a C_{42} .

Con respecto a la microbiota a los 28 y 42 días de crianza, se registró, para ambas dosis de polen apícola, un aumento en el conteo de BAL respecto de C, a diferencia de lo observado en RHP y HL. Este comportamiento en las BAL podría motivar el descenso en el conteo de la microflora acompañante, debido al notable mecanismo de exclusión competitiva propio de las BAL e indicaría la adaptación microbiana al nuevo sustrato (Vega *et al.*, 2022).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la presencia de grupos microbianos benéficos como BAL contribuiría a mejorar la calidad de las excretas crudas, como pudo determinarse en investigaciones realizadas en la UEA, cuando se utilizaron otros aditivos para la crianza de pollos parrilleros (Couto, 2019; Savy, 2019; Lincor, 2023).

6.2.- INTESTINO

6.2.1.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Tabla 4. Parámetros microbiológicos determinados a partir de la porción media del intestino delgado de pollos parrilleros en el día 43 de crianza, alimentados con dietas diferenciales.

	C	PI	PII	P =	EE
RHP	3,51 b	5,26 c	1,82 a	< 0,0001	0,1620
HL	3,4 a	2,71 a	2,77 a	0,2850	0,2616
BAL	4,35 a	4,18 a	4,78 b	0,0038	0,0280
CT	2,83 a	2,56 a	3,35 a	0,7218	0,8095
CF	2,34 a	2,56 a	3,35 a	0,7079	1,3345

C: Control - dieta basal; PI: dieta basal con 1% de polen apícola; PII: dieta basal con 2% de polen apícola. RHP: bacterias aerobias mesófilas; HL: hongos y levaduras; BAL: bacterias ácido lácticas; CT: coliformes totales; CF: coliformes fecales. Resultados expresados como \log_{10} UFC.g⁻¹ de intestino delgado. Letras distintas indican diferencias significativas. EE: error estándar.

La **Tabla 4** muestra que en las determinaciones efectuadas en ID, se observaron diferencias en RHP, HL y BAL, con una disminución de los valores de RHP y HL; y un aumento de los niveles de BAL en las dietas con PA. Cabe destacar que comparando PI con PII, esta última dosis produjo un descenso de los grupos microbianos RHP y un

aumento de las BAL. Esto concuerda con lo observado por García Paoloni (2021) en estudios de caracterización de PA de diversos orígenes.

Es de esperar que BAL sea el grupo fisiológico con mayor recuento de UFC, porque predominan naturalmente en la ecobiota del ID (La Ragione *et al.*, 2005). Ciertos carbohidratos presentes en la dieta podrían favorecer el proceso de adhesión de las BAL al epitelio intestinal, contribuyendo a la colonización de estos microorganismos (Fuller, 1975). Adicionalmente, podría inferirse la acción del PA en este proceso, ya que los carbohidratos son el componente mayoritario del PA (García Paoloni, 2021) y están representados por almidón y componentes de la pared celular (Stanley y Linskens, 1974). Además, los azúcares presentes en el PA como fructosa, glucosa y sacarosa, comprenden alrededor del 90 % de todos los azúcares de bajo peso molecular (Bogdanov *et al.*, 2003). Los carbohidratos del PA se encuentran en mayor proporción respecto de los presentes en el polen floral por el néctar que agregan las abejas pecoreadoras para compactar la carga corbicular (Cornejo, 1994).

Una característica importante que tienen las BAL es la capacidad de producir bacteriocinas, sustancias que poseen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias con potencial patogenicidad (Darabi *et al.*, 2014), de aquí surge la importancia de encontrar un aumento en el recuento de este grupo fisiológico con el complemento de PA en la dieta de los pollos.

En cuanto a los grupos fisiológicos CT y CF, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (CT: $p = 0,72178$; CF: $p = 0,7079$) respecto de C. Este comportamiento podría deberse a la relación comensalista que demuestran los coliformes cuando las condiciones del ambiente entérico son favorables, contribuyendo a la estabilidad intestinal (La Ragione, 2001).

El estudio de la microbiota fecal permite evaluar los cambios producidos en la dieta y conocer el estado de salud de los pollos, ya que contiene bacterias pertenecientes a distintos segmentos del TGI (Sekelja *et al.*, 2012). La correlación existente entre los resultados de recuento microbiano entre las excretas crudas e ID, se ha corroborado en otros ensayos realizados en la UEA (Couto, 2019; Savy, 2019).

6.2.2.- pH

La **Figura 2** se pueden observar los valores de pH obtenidos para el contenido intestinal, donde no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) indicando condiciones homeostáticas adecuadas en todos los tratamientos.

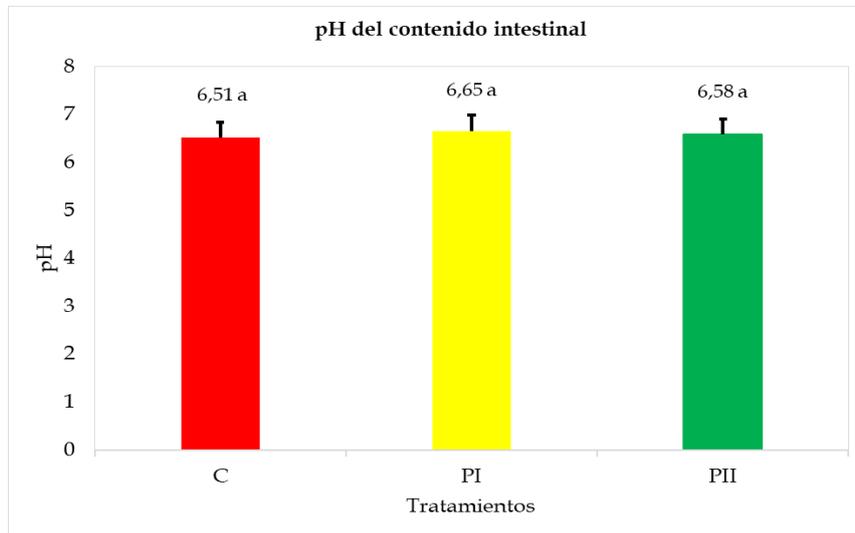


Figura 2. Valores de pH correspondientes a los tratamientos, C: Control (dieta basal); PI: dieta basal + 1% polen apícola; PII: dieta basal + 2% polen apícola, expresados en la escala de pH (0-14).

Según los estudios realizados por Lincor (2023), la presencia de BAL contribuye a la acidificación del medio intestinal. Si bien en el presente ensayo los tratamientos con PA presentaron mayores niveles de BAL, esto no se vio reflejado en el pH del contenido intestinal. Estos resultados podrían atribuirse a la compleja composición del PA. García Paoloni (2021) demostró la diversidad del contenido proteico en distintos pólenes apícolas. Taha *et al.* (2019) han determinado que el PA puede contener más de 16 aminoácidos. Estas características proteicas particulares, junto con la presencia de carbohidratos, compuestos flavonoides, fitoesteroles, vitaminas, lípidos y minerales, podrían contribuir a la estabilización en los valores de pH intestinal (Campos *et al.*, 2008; Mărgăoan *et al.*, 2010; Formicki *et al.*, 2013; Bogdanov, 2014, 2016).

6.3.- *Salmonella* spp.

Los resultados del presente estudio indican la ausencia de *Salmonella* spp. en excretas e ID. Se ha visto que las dietas que incluyen Lactobacilos mejoran la producción de anticuerpos contra *Salmonella* spp. (Dunham *et al.*, 1993). Abuda *et al.* (2011) encontraron que muestras de PA y pan de abeja tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de una amplia gama de microorganismos. En un estudio realizado en Brasil con PA, De Olivera *et al.* (2013), encontraron que la suplementación de alimentos para pollos de engorde con hasta un 1,5 % de PA resultó en un aumento de la inmunidad de las aves.

Las normas de bioseguridad han sido estrictamente aplicadas en el presente ensayo, evitando las condiciones que pudieran predisponer a los pollos a la presencia de *Salmonella* spp. (Caffer *et al.*, 2008).

7.- CONCLUSIONES

- La incorporación de PA a la dieta de los pollos parrilleros durante la crianza optimiza la calidad microbiológica de las excretas crudas, generando eubiosis.
- La mayor dosis utilizada de PA demostró que este complemento es inocuo y constituye un factor equilibrante de la microbiota intestinal, promoviendo el desarrollo de las BAL.
- El contenido natural de proteínas y compuestos bioactivos del polen apícola contribuiría a la estabilidad del pH intestinal, favoreciendo la ecobiota benéfica con ausencia de *Salmonella* spp.
- El PA favorece la crianza sustentable de pollos parrilleros en el marco de una economía circular.
- El PA es recomendable como complemento en la dieta de pollos parrilleros, por los beneficios comprobados que aporta en materia de salud intestinal, contribuyendo al bienestar del animal a lo largo de la crianza.
- Como perspectiva futura, sería interesante realizar nuevas contribuciones referidas a la composición química del polen apícola, que ayuden a mejorar la comprensión del mecanismo y efecto que produce este complemento sobre la dinámica de la microbiología entérica de los pollos parrilleros.

8.- ANEXO

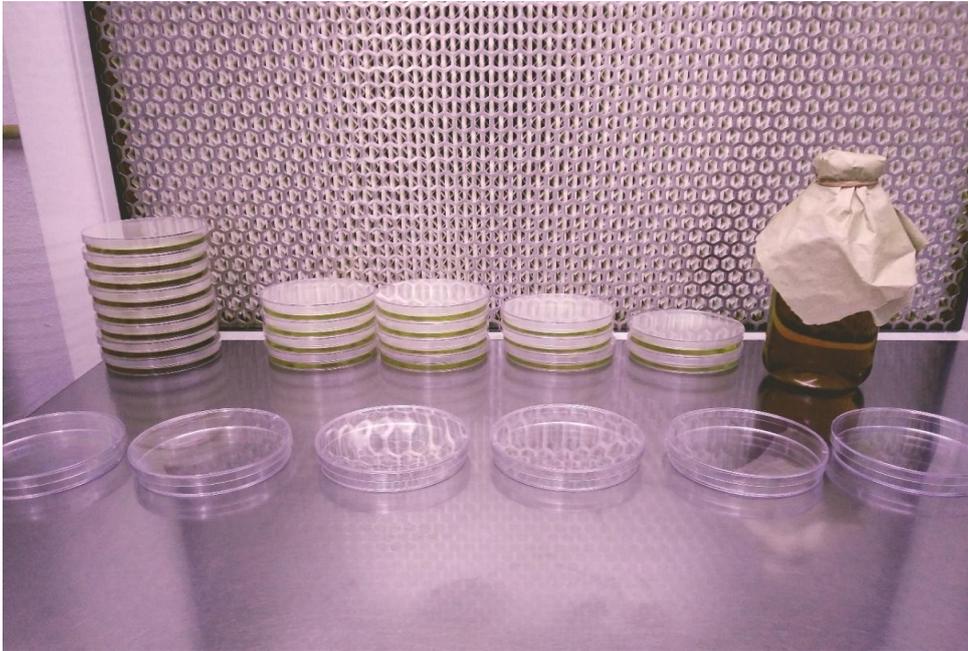


Imagen 1. Preparación de medios microbiológicos para determinación de RHP, HL y BAL, en cajas de Petri descartables. Flujo laminar nivel I, Laboratorio de Microbiología Agrícola. Departamento de Agronomía, UNS.

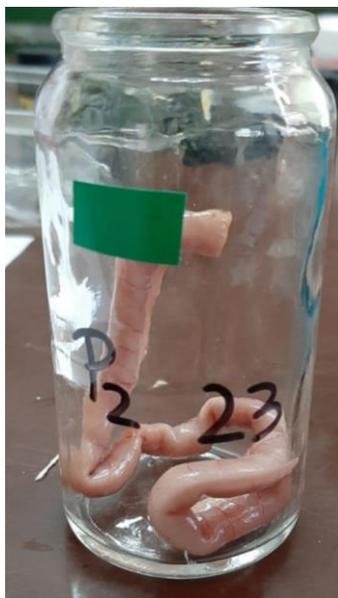


Imagen 2. Porción de intestino delgado recolectada en frasco rotulado con el tratamiento y número de animal.



Imagen 3. Contenido intestinal recolectado para determinación de pH.



Imagen 4. Siembra por disseminación en superficie mediante el método de diluciones seriadas en flujo laminar nivel I, Departamento de Agronomía - UNS.

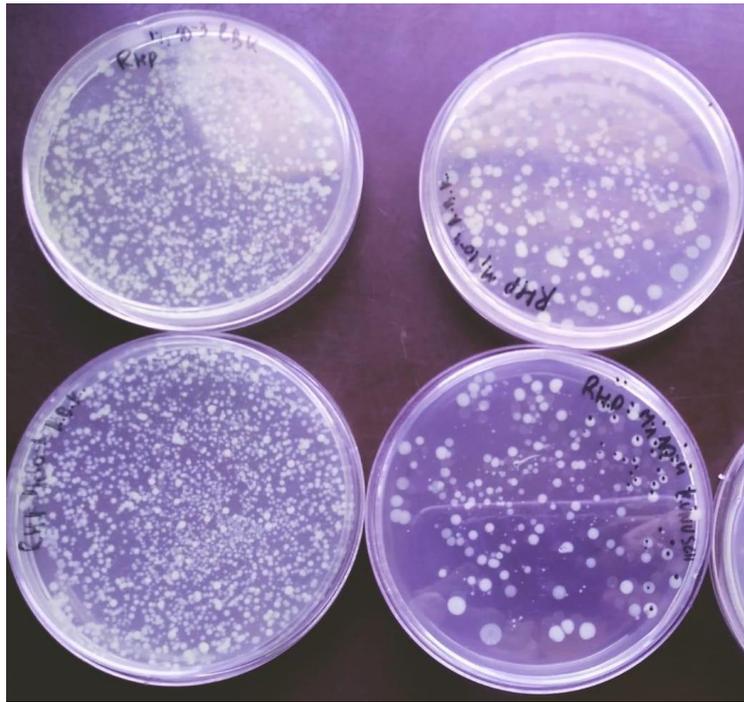


Imagen 5. Desarrollo de colonias de microorganismos en medio Agar Nutritivo Britania® para recuento RHP en el tratamiento C en excretas.

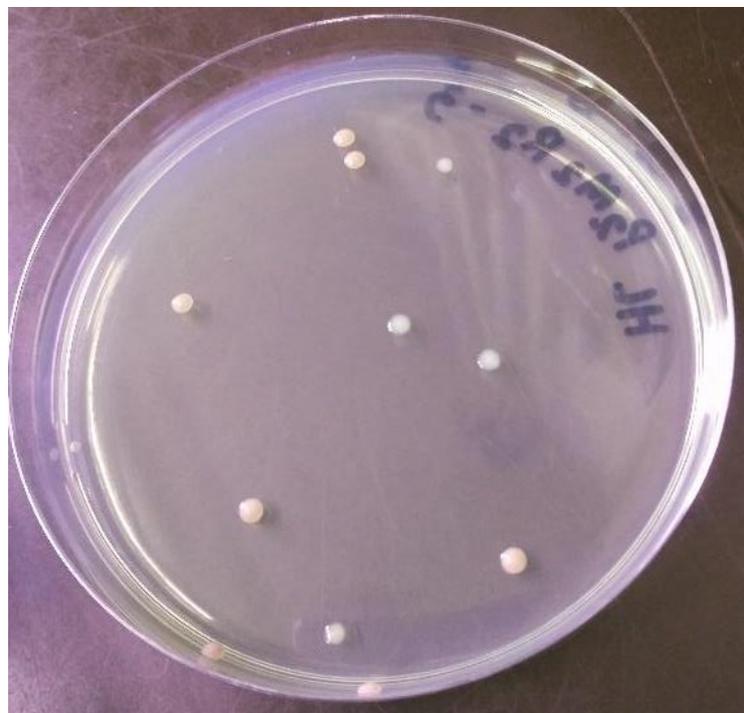


Imagen 6. Desarrollo de colonias de microorganismos en medio selectivo Hongos y Levaduras Britania® con cloranfenicol para el recuento de HL en el tratamiento PII en ID.

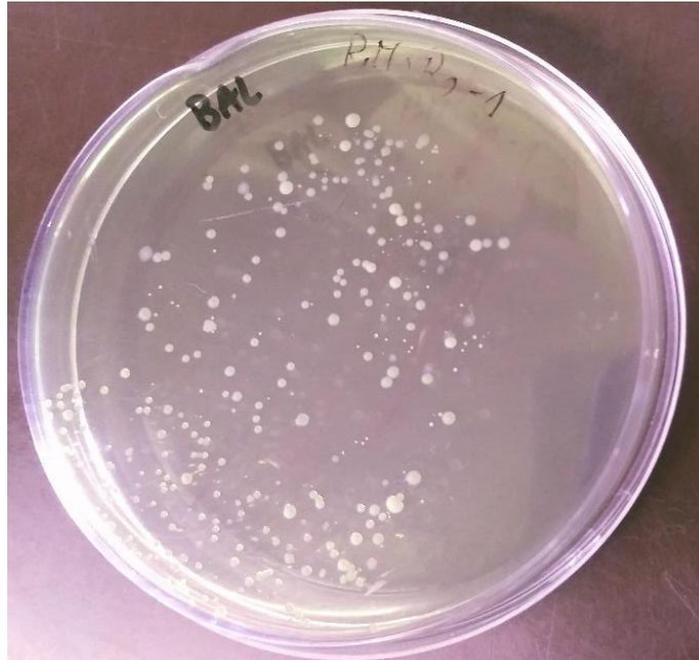


Imagen 7. Desarrollo de colonias de microorganismos en medio selectivo MRS Britania® para el recuento de BAL en el tratamiento PI en excretas.



Imagen 8. Tubos de ensayo con caldo Mac Conkey. Prueba de determinación de coliformes totales mediante la técnica del NMP. Izquierda: tubos con medio Mac Conkey y campana de Durham. Derecha: resultados positivos evidenciados con viraje de color y acumulación de gas en campana de Durham.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abad, R.; Capa, M.; Herrera, V.; Herrera, R.; Escudero, G. 2017. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. Centro de Biotecnología. Pp. 98-108. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/323152630>
- Abdelnour, S.A.; Abd El- Hack, M.E.; Alagawany, M.; Farag, M.R.; Elnesr, S.S. 2019. Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Vol. 103. N° 2. Pp. 477-484.
- Abouda, Y.; Zerdani, I.; Kalalou, I.; Faid, M.; Ahami, M.T. 2011. The antibacterial activity of moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Research Journal Microbiology*. Vol. 6. Pp. 376-384.
- AOAC International. 2002. Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. Vol. 85. N° 5. Pp. 1187-1200. Disponible en:
<https://doi.org/10.1093/jaoac/85.5.1187>
- APHA. Cleresci, L.; Greenberg, A.; Trussell, R. 1992. *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Editorial Días Santos, S.A. España.
- Ares, A.M.; Valverde, S.; Bernal, J.L.; Nozal, M.J.; Bernal, J. 2018. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 147. Pp. 110-124.

- Basim, E.; Basim, H.; Özcan, M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. JOURNAL OF FOOD ENGINEERING. Vol. 77. N° 4. Pp. 992-996. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.027>

- Bichara, A.; Salerno, C. M. 2019. Tesis. Estudio del potencial probiótico de *Saccharomyces* spp. aisladas de intestino de pollos parrilleros. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 35 pp.

- Blajman, J.; Zbruna, M.; Astesana, D.; Berisvil, A.; Romero, A.; Fusari, M.; Sotoa, L.; Signorini, M.; Rosmini, M.; Frizzo, L. 2015. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA. Vol. 47. N° 4. Pp. 360-367.

- Blajman, J. 2017. Tesis doctoral. Desarrollo de un inóculo probiótico para pollos parrilleros y monitoreo durante su tránsito intestinal y en órganos del medio interno. Departamento de Salud Pública Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Buenos Aires, República Argentina. 144 pp.

- Bogdanov, S.; Bieri, K.; Gremaud, G.; Iff, D.; Känzig, A.; Seiler, K.; Stöckli, H.; Zürcher, K. 2003. Bienenprodukte; 23 B Pollen. Swiss Food Manual Schweiz. Lebensmittelbuch. Pp. 1-6.

- Bogdanov, S. 2004. Quality and Standards of Pollen and Beeswax. Apiacta. Vol. 38. Pp. 334- 341.

- Bogdanov, S. 2014. Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review. Bee Product Science. Disponible en: www.bee-hexagon.net

- Bogdanov, S. 2016. Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health. Bee Product Science. Pp. 1-31.
- Bogdanov, S. 2017. Honey for medicine and health: a review. Bee Product Science. Pp. 1-23. Disponible en:
www.beehexagon.net
- Bogdanov, S. 2020. Antiviral properties of the bee products: A Review. Bee Product Science. Disponible en:
www.bee-hexagon.net
- Caffer M.I.; Terragno R.; Binsztein N. 2008. Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización *Salmonella* spp. ANLIS. Instituto Dr. C. Malbrán de Buenos Aires. República Argentina. Disponible en:
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_ficha_tecnica_salmoneiosis.pdf
- Campos, M. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. JOURNAL OF APICULTURE RESEARCH. Vol. 47. N° 2. Pp. 156-163.
- Cardín, R. 2018. Informes de cadenas de valor apícola. Ministerio de Hacienda. Secretaría de Política Económica. Subsecretaría de Programación Microeconómica. Buenos Aires.
- Comisión Europea. 2006. Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
- Cornejo, L. G. 1994. Polen. Tecnología de su producción, procesado y comercialización, Editorial. La Plata.

- Couto, A.; Salerno, C. M. 2019. Tesis. Uso de harina de chía e hidroxitirosol en pollos parrilleros. Dinámica microbiana de las excretas. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 37 pp.

- Crane, E. 1990. Bees and beekeeping. Science, practice and world resources. Oxford: Heinemann Newnes.

- Darabi, P.; Goudarzvand, M.; Natanzi, M.M.; Khodaii, Z. 2014. Antibacterial activity of probiotic bacteria isolated from broiler feces and commercial strains. Int J Enteric Pathog. Vol. 2. N° 3. Disponible en:
<https://doi.org/10.3382/ps.2008-00503>

- De Oliveira, M.C.; Da Silva, D.M.; Loch, F.C.; Martins, P.C.; Días, D.M.B.; Simon, G.A. 2013. Effect of bee pollen on the immunity and tibia characteristics in broilers. BRAZILIAN JOURNAL OF POULTRY SCIENCE. Vol. 15. N° 4. Disponible en:
<https://doi.org/10.1590/S1516-635X2013000400006>

- Dunham, H.J.; Williams, C.; Edens, F.W.; Casas, L.A.; Dobrogosz, W.J. 1993. *Lactobacillus reuteri* immunomodulation of stress associated diseases in newly hatched chickens and turkeys. Poultry Sci. Pp. 72-103.

- Donoso, M. J. 2014. Tesis. Efecto de la inclusión de probióticos en el agua de bebida sobre la microflora intestinal de pollos broiler. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago. Chile. 33 pp. Disponible en:
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/132108>

- Dudov, I. A.; Morenets, A. A.; Artyukh, V. P.; Starodub, N. F. 1994. Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal. Vol. 66. N° 6. Pp. 91-93.

- Fazayeli-Rad, A.R.; Afzali, N.; Farhangfar, H.; Asghari, M.R. 2015. Effect of bee pollen on growth performance, intestinal morphometry and immune status of broiler chicks. *European Poultry Science*, 79.
- Federico, J.F. 2016. Manual de normas básicas de bioseguridad de una granja avícola. INTA. República Argentina. 44 pp.
- Fernández, L.A.; Gallez, L. M.; Pérez, M. B.; Alippi, M.A.; López, F.; Iaconis, D. 2017. Microbiología apícola: valorización del polen en la industria alimentaria. *Campo & Abejas*. Vol. 20. N° 115. Pp. 3-6.
- Formicki, G.; Greń, A.; Stawarz, R.; Zyśk, B.; Gał, A. 2013. Metal Content in Honey, Propolis, Wax, and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 22. N° 1. Pp. 99–106.
- Fuller, R. 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of Lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.* 87, 245–250.
- Gabriel, I.; Lessire, M.; Mallet, S.; Guillot, J.F. 2006. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poult. Sci. J.* Vol. 62. N° 3. Pp. 499-511.
- Gaggia, F.; Mattarelli, P. and Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. Food Microbiol.* N° 141. Pp. 15-28.
- García Paoloni, M. S. 2021. Tesis doctoral. Caracterización y clasificación de polen apícola argentino según el origen botánico y composición química. Universidad Nacional del Sur. Departamento de Química, Bioquímica y Farmacia. República Argentina. 162 pp.

- Huyghebaert, G.; Ducatelle, R. and Van Immerseel, F. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* N° 187. Pp. 182-188.

- Johansen, C.H.; Bjerrum, L.; Finster, K. y Pedersen, K. 2006. Effects of a *Campylobacter jejuni* infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. *Poult. Sci.* Vol. 85. Pp. 579 - 587.

- Kačániová, M.; Rovná, K.; Arpášová, H.; Hleba, L.; Petrová, J.; Haščík, P.; Čuboň, J.; Pavelková, A.; Chlebo, R.; Bobková, A.; Stričík, M. 2013. The effects of bee pollen extracts on the broiler chicken's gastrointestinal microflora. *Research in Veterinary Science*, Vol. 95. Pp. 34-37. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528813000763>

- Kalmar, I.D.; Vanrompay, D.; Janssens, G.P.J. 2013. Broiler ascites syndrome: collateral damage from efficient feed to meat conversion. *Vet J.* Vol. 197. Pp. 169-174.

- Kostić, A.Ž.; Milinčić, D.D.; Barać, M.B.; Ali Shariati, M.; Tešić, Ž.L.; Pešić, M.B. 2020. The application of pollen as a functional food and feed ingredient - the present and perspectives. *Biomolecules*. Vol. 10. N° 1. Pp. 84.

- Král, M.; Angelovicová, M.; Alfaig, E.; Walczycka, M. 2013. Meat quality of broiler chickens fed diets with *Bacillus subtilis* and malic acid additives. *Scientific Papers. Animal Science and Biotechnologies*. Vol. 46. N°2. Pp. 8-375.

- Kročko, M.; Čanigová, M.; Bezeková, J.; Lavová, M.; Haščík, P.; Ducková, V. 2012. Effect of nutrition with propolis and bee pollen supplements on bacteria colonization pattern in gastrointestinal tract of broiler chickens. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. Vol. 45, N° 1. Pp. 63-63.

- La Ragione, R.M., Cooley, W.A., Woodward, M.J., 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J. Med. Microbiol.* 48, 327-338.

- La Ragione, R.; Newell, D.; Woodward, M. 2005. Bacterial colonization of avian mucosal surfaces. *Microbial Ecology in Growing Animals*. Elsevier. Londres. Inglaterra. Vol. 2. Pp. 258-278.

- Lakhan, S.E.; Kirchgessner, A. 2010. Gut inflammation in chronic fatigue syndrome. *Nutrition & Metabolism*. Vol. 7. Artículo 79. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-79>

- Lan, Y.; Verstegen, M.W.A.; Tamminga, S.; Williams, B.A. 2005. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *WORLD'S POULT SCI J.* Vol. 61. N° 1. Pp. 95-104.

- Lanaro, J.S.; Salerno, C. M. 2019. Tesis de grado. Estudios ecológicos de poblaciones nativas de levaduras del género *Saccharomyces* aisladas del intestino de pollos parrilleros. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 40 pp.

- Lincor, D. 2023. Tesis de Magíster en Ciencias Agrarias. Caracterización fenotípica de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en carne de pollo. Empleo de bacterias ácido lácticas nativas como antagonistas. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 285 pp.

- Londero A. 2012. Tesis doctoral. Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con

microorganismos de kéfir. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 308 pp.

- Lorini, A.; da Rosa, C.C.B.; Oliveira, L.T.; Wobeto, C. 2020. Chemical composition and microbiological quality of bee pollen. *Scientia Agraria Paranaensis*. Pp. 229-235
- Mahmood, T.; Guo, Y. 2020. Dietary fiber and chicken microbiome interaction: Where will it lead to. *Anim Nutr*. Vol. 6. Pp. 1-8.
- Mărgăoan, R.; Mărgăhitas, L.A.; Dezmirean, D.; Mihai, C. M.; Bobis, O. 2010. Bee Collected Pollen - General Aspects and Chemical Composition. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. Faculty of Animal Science and Biotechnologies. Vol. 67. N° 1-2. Pp. 254-259.
- Ministerio de Economía. Secretaría de Bioeconomía. República Argentina. 2023. Anuario Avícola 2023. Año XXVIII N° 86. Disponible en: www.magyp.gob.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/_archivos//230000_Anuario%20Avicola%202023.pdf
- Nogueira, C; Iglesias, A; Feás, X.; Estevinho, L.M. 2012. Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins : A Comprehensive Approach. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 13. N° 9. Pp. 11173-11187.
- OECD - FAO Agricultural Outlook 2023 - 2032: Part I. 2023. Organization for Economic Co-operation and Development - Food and Agricultural Organization of the United Nations. Pp. 184-201. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cc6361en/cc6361en.pdf>
- O'Hara A.M.; Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. Vol. 7. N° 7. Pp. 688-93.

- Olvera García M.; Leyva-Jiménez H. 2020. Importancia de la microbiota intestinal de las aves y su posible regulación con el uso de fibras. ResearchGate.
- Pan, D.; Yu, Z. 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. Gut microbes. Vol. 5. N° 1. Pp. 108-119.
- PlusVet, Departamento Técnico. 2022. Disbiosis, una patología poco conocida pero de gran impacto. Engormix. Micotoxinas. Micotoxinas en Avicultura. Disponible en:
https://www.engormix.com/micotoxinas/micotoxinas-avicultura/disbiosis-patologia-poco-conocida_a49807/?utm_source=notification&utm_medium=email&utm_campaign=0-1-0&smId=06c8a74f67602d0ac3161224a40f7dd7&src_ga=1
- Popiela-Pleban, E.; Roman, A.; Dobrzanski, Z.; Pogoda-Sewerniak, K.; Opalinski, S.; Korczynski, M. 2012. Effect of propolis and bee-collected pollen supplementation on selected blood parameters of laying hens. In Proceedings of the 24th World Poultry Congress, Salvador, Brazil, 5-9 August 2012. Pp. 505-508.
- Savy, G.; Salerno, C. M. 2019. Tesis. Uso de harina de chíá e hidroxitirosol en dietas de pollos parrilleros. Impacto en la ecobiota microbiana de las excretas. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 60 pp.
- Sekelja, M.; Rud, I.; Knutsen, S.H.; Denstadli, V.; Westereng, B.; Naes, T.; Rudi, K. 2012. Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 79. Pp. 2941-2948.

- Singh, K.M., Shah, T.M., Reddy, B., Deshpande, S., Rank, D.N., y Joshi, C.G. (2013). Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. JOURNAL OF APPLIED GENETICS. Vol. 55. N° 1. Pp. 145-154.

- Soares de Arruda, V.A.; Viera dos Santos, A.; Figueiredo Sampaio, D.; da Silva Araújo, E.; de Castro Peixoto, A. L.; Estevinho, L. M.; de Almeida Muradian, L. B. 2020. Brazilian bee pollen: Phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. Vol. 60. N° 5. Pp. 775-783.

- Stanley, D.; Geier, M.S.; Hughes, R.J.; Denman, S.E.; Moore, R.J. 2013. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. PloS One. Vol. 8. N° 2.

- Stanley, R. G.; Linskens, H. F. 1974. Pollen. Biology - Biochemistry - Management. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

- Terra Celidonio, R. 2017. Tendencias genéticas en las líneas pesadas. AviNews. N° 25. Pp. 39-46. Disponible en:
<https://issuu.com/avinews/docs/avinews-junio-2017?e=9859044/49639311>

- Thakur, M.; Nanda, V. 2020. Composition and functionality of bee pollen: A review. Trends Food Sci. Technol. Vol. 98. Pp. 82-106.

- Thirumalaisamy, G.; Muralidharan, J.; Senthilkumar, S.; Hema Sayee, R.; Priyadharsini, M. 2016. Cost-effective feeding of poultry. INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE, ENVIRONMENT AND TECHNOLOGY. Vol. 5. N° 6. Pp. 3997-400.

- Vega, S.; Montoro-Dasi, L.; Marín, C. 2022. Microbiota intestinal en avicultura: el órgano olvidado. *Anales de Microbiota, Probióticos & Prebióticos*. Vol. 3. N° 2. Pp. 116-131.
- Wang, J.; Li, S.; Wang, Q.; Xin, B.; Wang, H. 2007. Trophic Effect of Bee Pollen on Small Intestine in Broiler Chickens. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. Korean Society of Food Science and Nutrition. Vol. 10. N° 2. Pp. 276–280.
Disponible en:
<https://doi.org/10.1089/jmf.2006.215>
- Zocco, M.A.; Ainora, M.E.; Gasbarrini, G.; Gasbarrini, A. 2007. Bacteroides thetaiotaomicron in the gut: molecular aspects of their interaction. *Dig Liver Dis*. Vol. 39. N° 8. Pp. 12-707.

9.1.- RECOMENDACIONES BIBLIOGRÁFICAS

- Cunningham, J.; Bradley, K. 2009. Fisiología y metabolismo gastrointestinal. *FISIOLOGÍA VETERINARIA*. 4º edición. Pp. 300-387. Elsevier España.
- Fernández, H.; Amela, M.I.; Salerno C.M. 2018. Harina de chía y *Bacillus subtilis* en la dieta de pollos parrilleros. Una propuesta sustentable. *AgroUNS*. ISSN 16685946. Año XV, N° 30. Pp. 10-12.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Perker, J.; Brock, J. 2003. *Biología de los microorganismos*. 10^{ma}. Ed. Madrid. España. Pearson Educación. 1011 pp.
- Pessini Moran, J. R.; Salerno, C. M. 2017. Tesis. Impacto de los aditivos harina de chía (*Salvia hispanica* L.) e hiroxitirosol, en la microflora intestinal de pollos parrilleros. Capacidad antagonista de BAL sobre bacterias productoras de ETA. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 49 pp.

- Schmidt, S.; Salerno, C. M. 2018. Tesis. Impacto de la harina de chía e hidroxitirosol en la ecobiota intestinal de pollos parrilleros. Capacidad inhibitoria *in vitro* del hidroxitirosol sobre bacterias causantes de ETA. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires. República Argentina. 50 pp.

- Steel, R.; Torrie, J.1980. Principles and procedures of statistics; a biometrical approach. Ed. McGraw-Hill, NY, USA. 481 pp.