

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**

TRABAJO DE INTENSIFICACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA.



**ESTUDIOS ECOLÓGICOS DE PROBLACIONES NATIVAS  
DE LEVADURAS DEL GÉNERO SACCHAROMYCES AISLADAS  
DEL INTESTINO DE POLLOS PARRILLEROS.**

**ALUMNA:** Lanaro, Julieta Sol

**DOCENTE TUTORA:**

Salerno, Carmen

**DOCENTES CONSEJEROS:**

Basualdo, Jessica

Fernández, Hebe

NOVIEMBRE 2019.

## **AGRADECIMIENTOS:**

En estas líneas deseo expresar mi profundo y sentido agradecimiento a mis padres y mis abuelos: Norma, Jorge, Estela y Omar quienes forjaron en mí el deseo de estudiar y pusieron a disposición todos sus recursos y el apoyo necesario para concretarlo.

A mis hermanos; Cecilia, Juan y Marianella que en todo momento se hicieron presentes para manifestar su pleno acompañamiento.

A mi novio Jonathan que me ayudó a transitar un camino maravilloso y lleno de amor.

A mis amigos, que fueron grandes pilares y sin ellos nada hubiese sido posible, en particular, a mi amiga Agustina Bichara que me brindó su contención y cariño durante todos estos años.

También agradezco a Carmen Salerno, una excelente tutora y consejera, buena y humilde persona, siempre predispuesta a escuchar y ayudar.

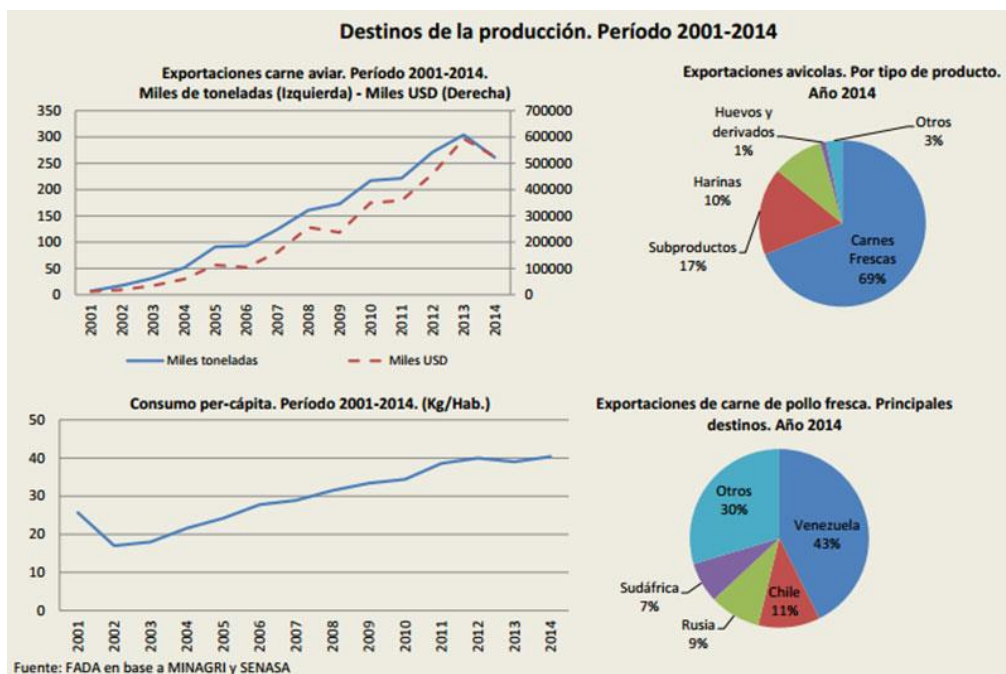
1.	INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.	Situación actual. ....	4
1.2.	La importancia del reemplazo de los antibióticos en producción de carne. ....	6
1.3.	<i>Saccharomyces</i> spp. utilizada como probiótico. ....	7
1.4.	Ambiente gástrico: acción de la pepsina. ....	9
2.	HIPÓTESIS .....	11
3.	OBJETIVOS .....	11
3.1.	Objetivos generales: .....	11
3.2.	Objetivos específicos: .....	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1.	Localización del lugar de trabajo.....	12
4.2.	Instalaciones.....	12
4.3.	Distribución de animales y manejo. ....	13
4.4.	Plan sanitario.....	13
4.5.	Dietas Experimentales. ....	14
4.6.	Muestreo.....	16
4.7.	Procesamiento de muestras. ....	16
4.8.	Determinaciones realizadas.....	17
4.8.1.	Prueba de confirmación para <i>Saccharomyces</i> spp.....	17
4.8.2.	Resistencia a diferentes rangos de temperatura y pH. ....	17
4.8.2.1.	Procedimiento .....	17
4.8.3.	Simulación del ambiente gástrico. ....	19
4.8.3.1.	Procedimiento .....	19
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1.	Resistencia a la temperatura.....	20
5.2.	Tolerancia al cambio de pH.....	22
5.3.	Supervivencia frente a un ambiente gástrico <i>in vitro</i> . ....	25
5.4.	Acción inhibitoria <i>in vitro</i> de los diferentes factores estudiados frente a las cepas de <i>Saccharomyces</i> spp. ....	28
6.	CONCLUSIONES.....	29
7.	ANEXO .....	30
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	35

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Situación actual.

El aumento de tamaño de la industria avícola ha sido el de mayor magnitud, dentro de las industrias de producción cárnica, acompañado por el consecuente incremento de la producción mundial de carne y huevos de aves de corral (Windhorst, 2006).

De la mano del advenimiento de la “revolución pecuaria”, la avicultura modificó su modalidad de producción extensiva con animales para múltiples propósitos. Se establecieron, de esta manera, sistemas intensivos con híbridos especializados y un alto nivel de integración (Di Masso y Dottavio, 2010).



**Figura 1:** Evolución de la industria avícola Argentina en el período 2001-2014. Fuente: [www.funfacionfada.org](http://www.funfacionfada.org)

La avicultura es una de las actividades pecuarias más importantes del país, encontrando su motor fundamental en las condiciones ambientales, con amplia disponibilidad de tierras, agua y materias primas (maíz y soja) para alimentar a las aves. Además, cuenta con un adecuado mejoramiento genético, una aplicación progresiva de buenas prácticas de manejo y un excelente estatus sanitario. En este sentido, cabe destacar que Argentina es un país libre de Influenza Aviar y Newcastle, lo que permite asegurar la calidad del producto y libera importantes barreras para el comercio internacional.

Gracias a los aportes de parte del sector privado, se proyectó el plan de expansión avícola, comprendido entre los años 2003 y 2010. Dicho plan tenía como objetivos

principales: aumentar el consumo de carne de pollo de 18 a 30 kg/hab/año (valor que fue superado al final del periodo, alcanzando 34,7 kg/hab/año), ampliar las instalaciones para reproductores y plantas de incubación, automatizar las plantas de faena e incorporar túneles continuos de congelado (SAGPYA, 2011).

En los años posteriores se consumió, en promedio, el 84% de la producción nacional, llegando en el año 2015 a consumirse 43 kg de carne aviar/hab/año. El gran aumento se debió, en parte, a que es un tipo de alimento bajo en grasas saturadas, con alto contenido proteico, y fundamentalmente a la reducción de su precio frente a la carne vacuna, considerada como carne sustituta. Por su parte, según el Boletín Avícola 2018 expedito por el Ministerio de Agroindustria, el consumo per cápita alcanzó 42.32 kg/hab/año, disminuyendo 2.6 % respecto al año anterior.

En el período 2009-2015 la producción de carne aviar creció a una tasa del 4,3 % (anual acumulada), debido al impulso otorgado por el incremento del consumo interno y a las ventas externas. El incremento en producción también se vio favorecido por un mayor peso promedio de las aves faenadas (2,76 kg/cabeza en 2014 a 2,81 kg/cabeza en 2015) (Cardin, 2016).

Durante el año 2018 la faena nacional de aves en establecimientos con habilitación de SENASA alcanzó 711 millones, 1,5% por debajo del año 2017. La faena se distribuyó mayoritariamente en las provincias de Entre Ríos (53 %) y Buenos Aires (34%) y en menor medida entre Santa Fe (5%), Córdoba (3%), Río Negro (3%). El 2% restante se reparte en las provincias de Mendoza, Salta, Jujuy y La Rioja (SENASA, 2019).

Datos otorgados por el Registro Nacional de Multiplicadores e Incubadores Avícolas (RENAVI), al 31/12/2018, mostraron que en nuestro país había 8,13 millones de reproductoras pesadas, de las cuales 3,06 millones estaban en recría y 5,07 millones en postura; proyectando una producción semanal de pollitos bebé para el primer semestre de 2019 de 17,52 millones (Agroindustria, 2018).

Durante el año 2018, la faena nacional de aves en establecimientos con habilitación de SENASA alcanzó 711 millones: 1,5 % por debajo del año 2017.

Actualmente, nuestro país ocupa el octavo lugar a nivel mundial como productor y el sexto como exportador, destinando en promedio un 16 % de la producción local al mercado externo. Argentina tiene inserción exportadora en mercados dinámicos e importantes como China, Chile, Emiratos Árabes y Sudáfrica y buscará penetrar en otros

mercados cuyas importaciones son crecientes como los de Canadá y EEUU (Cardin, 2016).

Las exportaciones de carne aviar (pollo entero, trozado y subproductos; no incluye otras especies avícolas) del año 2018 totalizaron 207 mil toneladas por un valor de 295 millones de U\$S FOB. Mientras que, las importaciones, tuvieron un aumento de 24 % en volumen y 28 % en valor, respecto al año 2017. El volumen alcanzó un total de 7,1 miles de toneladas por un valor de 14,9 miles de dólares CIF. El origen de las mismas fue Brasil.

## **1.2. La importancia del reemplazo de los antibióticos en producción de carne.**

La capacidad de producción de carne de pollo está sujeta a la disponibilidad de alimentos de buena calidad y al control eficiente de enfermedades (Windhorst, 2006). Los antibióticos, son utilizados para prevenir y curar distintos tipos de infecciones que afectan a los animales de granja, pero también se agregan a la alimentación para ser usados como promotores del crecimiento, y de esta forma, acelerar el incremento de peso en animales sanos (Aarestrup, 1999).

Este efecto positivo se descubrió de manera accidental, cuando en el año 1949, Stokstad y Jukes, utilizaron un cultivo de *Streptomyces aureofaciens* como un producto de bajo costo que se consideró útil para el aporte de vitamina B12. Sin embargo, otros estudios mostraban que los *Streptomyces* eran productores de numerosos antibióticos como la clortetraciclina, estreptomicina y cloranfenicol.

El ensayo realizado con pollos utilizando el cultivo de *S. aureofaciens*, permitió inferir que el crecimiento de las aves no sólo era por la acción de la vitamina, sino también por los efectos de los antibióticos. Más tarde, otros antibióticos mostraron tener efectos similares y a partir de la década del '50 se convirtió en rutina agregarlos a las dietas (Bezoen *et al.*, 1999).

Desafortunadamente, su uso prolongado y mantenido en el tiempo con fines veterinarios tuvo como consecuencia que ciertas cepas bacterianas adquirieron resistencia. Además, se desarrolló una gran cantidad de residuos en la carne y en los subproductos (Aarestrup, 1999). Los genes que codifican esta resistencia, también pueden transferirse a otras bacterias que anteriormente eran susceptibles, por lo que representa una

importante amenaza para la salud, tanto animal como humana (Montagne *et al*, 2003). Por esa razón su uso fue prohibido en muchas partes del mundo (por ejemplo, en la Unión Europea), dando lugar a que se postularan alternativas viables para reemplazarlos (Gutiérrez Ramírez y col., 2013).

En la búsqueda intensa de un proceso avícola productivo que haga hincapié en la seguridad de los consumidores, los animales y el medio ambiente, aparecieron aditivos como reemplazantes, tales como: probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, enzimas, antioxidantes, entre otros (Díaz López y col., 2017).

El término probiótico se utilizó por primera vez para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Esta palabra deriva del latín -PRO- que significa por o a favor de, y del griego -BIOS- que quiere decir vida (Fuller, 1989). La definición actual más completa, es: “Preparación o producto que contiene microorganismos viables definidos, en cantidad suficiente para alterar la microflora (por implantación o colonización) en el intestino, ejerciendo efectos benéficos sobre el huésped” (Teitelbaum y Walker, 2002). El mecanismo de acción se basa en mejorar la fisiología del hospedante, al modular la inmunidad de la mucosa y la inmunidad sistémica, así como también estimular la estabilización del balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal (Tannok, 1999).

Para que un microorganismo pueda cumplir con esta función de protección, tiene que poseer ciertas características tales como (Reid, 2000):

- Ser habitante normal del intestino.
- Tener un tiempo corto de reproducción.
- Ser capaz de producir compuestos antimicrobianos.
- Ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución, para que pueda mantenerse vivo en el intestino.
- Ser seguro para el animal, sin causar enfermedad ni toxicidad.

### **1.3. *Saccharomyces* spp. utilizada como probiótico.**

*Saccharomyces* spp. es una levadura del tipo ascomiceta, que se muestra generalmente en su forma vegetativa como una célula ovoide, aunque bajo ciertas circunstancias de limitación de nutrientes las células se elongan, dando lugar a un crecimiento pseudohifal (Gimeno y col., 1992). Las colonias suelen ser blancas y cremosas (Barnett y

col., 2000), aunque también se ha descrito que ciertas cepas pueden crecer, como colonias rugosas, con aspecto irregular (Gimeno y col., 1992).

Se trata de un tipo de levadura que se encuentra en el ambiente, como célula haploide o diploide creciendo vegetativamente cuando hay abundancia de nutrientes. Constituye el modelo eucariota por excelencia, de hecho, es uno de los organismos más estudiados y mejor caracterizados del planeta, siendo el primer organismo eucariota del que se conoció la secuencia completa de su genoma (Goffeau y col., 1996).

En los monogástricos, los probióticos deben sobrevivir a las enzimas gástricas e intestinales, para alcanzar intactos el intestino grueso, donde ejercerán su acción. La especificidad de especies probióticas en el animal, es un factor muy importante que interfiere en la colonización y en la adhesión in vivo de los microorganismos (Frizzo *et al.*, 2006), por lo que es necesario realizar una adecuada evaluación de cepas de acuerdo con diferentes criterios de selección (resistencia al ácido, sales, temperatura, etc.), para que los organismos nativos lleguen en estado viable y en cantidades suficientes una vez que superaron las barreras del tracto digestivo (Tuomola *et al.*, 2001). El éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección *in vitro* (Rondón *et al.*, 2008).

Como resultado del uso de preparados probióticos en dietas programadas para el engorde de pollos parrilleros de distintas razas, se han observado importantes mejoras en la conversión alimenticia y ganancia de peso (Miazzo *et al.*, 1994), además de un aumento en la calidad de la carne debido a una mayor ternura y estabilidad oxidativa (Zhang *et al.*, 2005).

En particular, se ha incluido preparados de *Saccharomyces* spp. en las raciones de las aves tanto como aditivo natural, como factor mejorador del crecimiento y de la calidad de la canal. Diferentes trabajos muestran la inclusión de la levadura de cerveza en las dietas de pollos parrilleros en sus distintas etapas de vida (Miazzo y Kraft, 1998; NRC 1994; Onifade, 1998).

*Saccharomyces*, ha sido reportada señalando que su uso como probiótico, reduce la carga de algunos microorganismos enteropatógenos, produce cambios favorables en la mucosa intestinal y mejora el comportamiento productivo con raciones bajas en proteína (González y Valenzuela, 2000). También, se le ha reconocido el hecho de ser



promotora de crecimiento, de aumentar la producción de vitamina B, ayudar a la ganancia de peso, mejorar la digestión de algunos alimentos, estimular el sistema inmune, la asimilación de nutrientes y corregir el balance de la población microbiana (Yépez, 1995).

Aunque ya ha sido ampliamente utilizada en alimentación animal, existen aspectos que se desconocen acerca de su capacidad como microorganismo probiótico y su mecanismo de acción, ya que las investigaciones se han enfocado en otros de uso frecuente como *Lactobacillus* spp. (Guslandi *et al.*, 2003).

#### **1.4. Ambiente gástrico: acción de la pepsina.**

El estómago de los monogástricos es un saco muscular, membranoso y secretorio, ubicado en el lado izquierdo y ventral del abdomen, cuyas principales funciones son: servir como cámara de almacenamiento temporal de la ingesta, producir el jugo gástrico, permitir la mezcla del alimento con las secreciones salivales y gástricas para formar el quimo y regular la salida de su contenido hacia el duodeno (Ehrmann *et al.*, 2002).

Macroscópicamente, el estómago se puede dividir en una región proximal que constituye el fondo; una región media de mayor área, denominada cuerpo, que produce principalmente HCl, pepsinógeno y moco; y una región distal llamada pilórica, en donde se produce moco, pepsinógeno y gastrina (Vallecilla, 2014).

Las funciones del HCl son: destruir bacterias, proporcionar un pH adecuado para la transformación del pepsinógeno en pepsina, permitir la actuación de la pepsina, y estimular el flujo biliar y pancreático. Cuando el pH del contenido estomacal se hace menor a 6 se inicia la transformación del pepsinógeno en pepsina. Por otra parte, el pH óptimo para la acción enzimática de la pepsina sobre los enlaces peptídicos de las proteínas, es de 1 a 3 (Morales, 2014; Ganon, 1989).

La pepsina es una endopeptidasa, que actúa a nivel estomacal, en un medio muy ácido (pH 1,8-2) rompiendo los enlaces peptídicos entre aminoácidos y liberando triptófano, fenilalanina, tirosina, metionina y leucina (Liener, 1989). Condiciones de pH superiores, resultan en una disminución significativa de esta actividad.

Dicha enzima inicia una primera digestión de proteínas que permite la acción hidrolítica de otras enzimas (tripsina, quimiotripsina, etc.). Si el ácido clorhídrico no fuese secretado, las proteínas no son adecuadamente digeridas y se convierten en un sustrato ideal para el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino, es decir, sucedería todo lo que normalmente se trata de evitar.

El objetivo del presente estudio fue evaluar las cepas de *Saccharomyces* spp. nativas aisladas del intestino de pollos parrilleros, ante las principales barreras químicas del tránsito gastrointestinal, para seleccionar aquellas que presenten mayor potencial probiótico.

## **2. HIPÓTESIS**

- El alimento suministrado a los pollos parrilleros provee de microorganismos potencialmente probióticos, que optimizan el equilibrio de la microflora en el ambiente intestinal.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivos generales:**

- Identificación de *Saccharomyces* spp. aisladas del intestino de pollos parrilleros.

### **3.2. Objetivos específicos:**

- Realizar estudios ecológicos (resistencia a temperatura y pH) con las cepas de *Saccharomyces* spp. en condiciones *in vitro* para analizar su potencial probiótico.
- Llevar a cabo pruebas de simulación de ambiente gástrico, evaluando la respuesta de las cepas de *Saccharomyces* spp. seleccionadas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Localización del lugar de trabajo.**

El ensayo se llevó a cabo 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). El período experimental se desarrolló entre los meses de septiembre y noviembre durante los cuales, se implementó como alternativa innovadora en la alimentación de pollos parrilleros, el agregado en forma individual y combinada, de una fuente de ácidos Omega-3 (harina de Chía: *Salvia hispánica*) y un antioxidante de origen vegetal, no nutricional (Hidroxitirosol).

### **4.2. Instalaciones.**

La experiencia se realizó en un galpón acondicionado de tipo cerrado de 7,00 x 5,00 m, provisto de ventilación forzada, calefacción, aire acondicionado e iluminación artificial, con el fin de mantener las condiciones adecuadas de temperatura de acuerdo a la edad del animal. El monitoreo de las temperaturas máximas y mínimas (mañana y tarde) dentro del galpón se llevó a cabo mediante la utilización de un termómetro por corral.

Los corrales fueron construidos en madera y alambre hexagonal. Los listones de madera que constituyeron la base, fueron además recubiertos por una malla plástica cuadrículada para facilitar la circulación normal de los animales. Esta malla permitió separar a los animales de las excretas.

Los corrales se encontraban suspendidos 20 cm por encima del piso del galpón, y estos fueron limpiados diariamente con el fin de evitar la contaminación ambiental (amoníaco) generada por las heces, que resulta perjudicial para los animales y el personal de trabajo.

Los mismos fueron ensamblados de manera que formaran 4 bloques, de 4 corrales cada uno. Las dimensiones de cada corral fueron de 1 m<sup>2</sup>, con una capacidad para alojar hasta 15 pollos parrilleros. La distribución de los 4 bloques permitió generar un área de circulación adecuada, maximizando el uso de la superficie disponible.

### **4.3. Distribución de animales y manejo.**

Se utilizaron 92 pollos parrilleros línea Cobb, provenientes de una incubadora comercial. Durante los primeros 21 días los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 46 pollos y mantenidos en dos corrales de 2,00 m<sup>2</sup> cada uno. Posteriormente, los animales fueron pesados y sexados utilizando como indicador el emplume rápido que presentan las hembras y el mayor desarrollo de la cresta y la barbilla de los machos, con el fin de construir lotes uniformes en cuanto a sexo y peso.

De este modo, se conformaron 16 grupos de 6 animales cada uno (3 machos y 3 hembras) que fueron colocados al azar en cada uno de los 16 corrales.

Durante las tres primeras semanas, las condiciones de temperatura fueron reguladas mediante la utilización de 4 campanas calefactoras con lámpara infrarroja de 250 watts y calefactores eléctricos portátiles. Posteriormente, la temperatura óptima ambiental fue mantenida mediante la utilización de extractores de aire y un equipo portátil de aire acondicionado.

Se proporcionaron 24 horas de luz mediante 1 tubo fluorescente de 52 watts por bloque durante todo el periodo experimental.

Hasta los 21 días se dispusieron comederos bandeja y bebederos con depósito invertido de 4 L en cada corral. Diariamente, los bebederos fueron higienizados y recargados asegurando la provisión continua de agua. En la última etapa de cría, cada corral contó con 2 bebederos automáticos tipo Nipple y un comedero canaleta de 1,00 m de largo.

Se llevaron registros diarios de mortalidad y se realizaron observaciones sobre comportamiento y estado general de los animales. Las prácticas de manejo y los protocolos experimentales respetaron las normas de bioseguridad establecidas para investigación por la Universidad Nacional del Sur, que se adhiere a las establecidas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) para la crianza de pollos parrilleros.

### **4.4. Plan sanitario.**

El plan de vacunación aplicado a todos los animales consistió en un antimicrobiano sintético de amplio espectro ENRO (enrofloxacin quimioterápico 1 mL/L) y un polivitamínico (1 g/L) en los bebederos, suministrados el primer día que inició la crianza.

Al séptimo día se vacunó (gota ocular) contra Newcastle y Bronquitis infecciosa. El día 15 se aplicó contra Gumboro en agua de bebida.

#### 4.5. Dietas Experimentales.

Durante las primeras tres semanas, los animales consumieron *ad libitum* un alimento “iniciador” (Tabla 1).

A partir de los 22 días hasta los 42 días de edad, los animales fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- **C:** dieta control.
- **W3:** dieta con 10% de harina de chía.
- **W3 + H:** dieta con 10% de harina de chía + Hidroxitirosol.
- **H:** dieta con Hidroxitirosol

**Tabla 1.** Ingredientes y composición química del alimento iniciador (0-21 días).

<b>Iniciador</b>	
<b><u>Ingredientes (%)</u></b>	
Maíz	62
Harina de Soja	30
Harina de Carne	5,75
Conchilla	0,75
Lisina	0,20
Sal	0,25
Núcleo Vitamínico Mineral	0,50
DL-metionina	0,15
<b><u>Composición química</u></b>	
EM (Kcal/kg)	3.035
PB (%)	19,66
Calcio (%)	1,05
Fósforo total (%)	0,69
Metionina + Cistina (%)	0,82
Lisina (%)	1,26
Lípidos (%)	4,10
Fibra (%)	2,85

Vitamina A: 8.000.000 UI; vitamina D<sub>3</sub>: 1.500.000 UI; vitamina E: 30.000 UI; vitamina B<sub>2</sub>: 3.800 mg; vitamina B<sub>6</sub>: 1.800 mg; vitamina B<sub>1</sub>: 1.200 mg; vitamina K<sub>3</sub>: 1.500 mg; ácido nicotínico: 26.000 mg; ácido pantoténico: 9.000 mg; ácido fólico: 600 mg; Biotina: 40 mg; Colina: 180 g; vitamina B<sub>12</sub>: 10.000 µg; Cobre 8.500 mg; Hierro: 50.000 mg; Iodo: 1000 mg; Manganeso: 70.000 mg; Selenio: 250 mg; Cobalto: 200 mg; Zinc: 60.000 mg; Antioxidante: 125 mg; Excipiente C.S.P.: 1000 g.

Como fuente de ácidos grasos Omega-3 se utilizó harina de chía (DESUS S.A) cuya composición química se presenta en la **Tabla 2**. En todos los tratamientos, el consumo de alimento fue *ad libitum* asegurando un rechazo del 10%.

El Hidroxitirosol (HYTOLIVE, GENOSA, España) fue suministrado a razón de 7,00 mg/kg PV/d. Este aditivo fue pesado diariamente y agregado a la dieta antes de ser ofrecida a los animales. La dosis fue ajustada semanalmente de acuerdo al aumento de peso de los animales.

La composición de las dietas experimentales se observa en la **Tabla 3**.

El contenido de proteína bruta (PB) y de fibra detergente neutra (FDN) se determinó según el procedimiento Kjeldahl (AOAC, 2000) y el sistema de los detergentes (Goering y Van Soest, 1970), respectivamente.

Se realizaron análisis de muestras del agua que revelaron la potabilidad e inocuidad de la misma según APHA (1992).

**Tabla 2.** Composición química de la Harina de Chía

Parámetro	Valor	Unidad
Materia Grasa	18,00	%
Proteínas	27,30	% (N x 6,25)
Ácido palmítico	7,76	%
Ácido esteárico	3,62	%
Ácido oleico	7,55	%
Ácido linoleico	20,50	%
Ácido linolénico	59,70	%
Valor energético	349,00	Kcal/100g
Cenizas	5,80	%
Hidratos de carbono	19,55	%
Humedad	7,90	%

La mezcla de los ingredientes utilizados fue realizada en una mezcladora "Marion Mixer" fabricada por la "Rapids Machinery Company" - Marion Iowa (EEUU).

**Tabla 3.** Ingredientes y composición química de las dietas experimentales (22-42 días).

<b>Terminador</b>	<b>C</b>	<b>W<sub>3</sub></b>	<b>W<sub>3</sub>+H</b>	<b>H</b>
<b>Ingredientes (%)</b>				
Maíz	69	69	69	69
Harina de Soja	23,5	16,65	16,65	23,5
Harina de Carne	6,3	6,3	6,3	6,3
Harina de Chía	-	10	10	-
Conchilla	0,3	0,3	0,3	0,3
Lisina	0,2	-	-	0,2
Sal	0,25	0,25	0,25	0,25
Núcleo Vitamínico Mineral	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-metionina	0,12	0,12	0,12	0,12
Hidroxitirosol	-	-	SÍ	SÍ
<b>Composición química</b>				
EM (Kcal/kg)	3128	3169	3169	3128
PB (%)	18,52	18,48	18,48	18,52
Calcio (%)	0,92	1	1	0,92
Fósforo total (%)	0,7	0,84	0,84	0,7
Metionina + Cistina (%)	0,74	0,74	0,74	0,74
Lisina (%)	1,11	1,18	1,18	1,11
Lípidos (%)	4,34	6	6	4,34
Fibra (%)	2,59	4,76	4,76	2,59

#### **4.6. Muestreo.**

Las muestras de intestino delgado se recogieron asépticamente el día de la faena. Se clasificaron según el tratamiento correspondiente, y se conservaron a -4 °C hasta el momento de inicio de las determinaciones microbiológicas planificadas para el presente ensayo.

#### **4.7. Procesamiento de muestras.**

Del total de intestino conservado por muestra, se pesaron 25 g. a los cuales se le aplicaron microlaceraciones transversales, haciendo uso de pinzas, bisturí y tablas de madera previamente esterilizadas. Luego se colocaron asépticamente en frascos con 225 mL de agua peptonada bufferada (Britania®) y se agitaron durante 30 min en agitador Vicking a 100 rpm.



#### **4.8. Determinaciones realizadas.**

#### **4.9. Prueba de confirmación para *Saccharomyces* spp.**

##### **Tinción simple con azul de metileno.**

La tinción simple y la posterior observación microscópica es una caracterización morfológica, y da una rápida presunción de los agentes observados en el material de estudio. Dado que las levaduras son incoloras, no presentan contraste con el medio en el que se encuentran suspendidas, y no pueden observarse claramente sin ningún tratamiento previo. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico.

##### **Identificación mediante claves dicotómicas.**

Luego de la observación al microscopio de los preparados en portaobjetos, se utilizaron las “Claves dicotómicas para la determinación de géneros de levaduras” (Hernansaez Meoros, 1962) para la identificación de *Saccharomyces*.

#### **4.10. Resistencia a diferentes rangos de temperatura y pH.**

Para llevar a cabo las pruebas preliminares, se sometió a todas las cepas de *Saccharomyces* spp. a distintos rangos de temperatura y pH, mediante los protocolos ampliamente utilizados para evaluar posibles cepas probióticas (Mantilla y col., 2005).

#### **4.11. Procedimiento**

**Primera etapa:** Las cepas que fueron aisladas y cultivadas en tubos pico de flauta con agar H y L, a 28 °C durante 48 hs, se inocularon en una alícuota de 20 mL de caldo YPG compuesto por: extracto de levadura 15%, peptona de carne 2% y glucosa 2% (dos Santos Martins y col., 2005). Este medio, fue modificado según cada parámetro a estudiar, por separado, para todas las cepas analizadas, de la siguiente forma:

Para pH: Se utilizó una solución de HCl 0.1 N para el ajuste, y como valores representativos se seleccionaron los siguientes: pH 4, pH 6, pH 7. Posteriormente, se realizó la incubación en estufa a 28 °C durante 24 hs.

Para temperatura: la variación se llevó a cabo mediante la modificación de temperatura de la estufa al momento de la incubación, sometiéndolas a 28, 36 y 41 °C durante 24 hs.

**Segunda etapa:** se estudió la cantidad inicial de microorganismos por mL mediante la comparación con la escala de McFarland, con el objetivo de comenzar a realizar las diluciones con una concentración ya conocida del microorganismo ( $1,5 \times 10^8$ ). Este proceso se llevó a cabo mediante el agregado de agua destilada estéril al caldo hasta igualar la turbidez de la solución patrón.

Luego, se extrajeron 10 mL para realizar la primera dilución en un nuevo frasco con 90 mL de YPG y se incubó nuevamente la preparación, durante 24 hs. Por último, se sembraron por duplicado las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$ , con una previa agitación de cada tubo en Vortex y se realizó el recuento en placa luego de la incubación de las cajas con agar YPG durante 48 hs.

Además de evaluarse las cepas nativas del intestino de los pollos, también se estudió la respuesta de una cepa comercial, disponible en el mercado.



**Figura 2.** Estimación de la concentración inicial de UFC/mL, mediante la comparación con estándares de turbidez suministrada por la escala McFarland.

Como prueba preliminar, también se expuso a las cepas a diferentes concentraciones de sales biliares (Bichara Agostina, 2019, sin publicar).

Además, se midió el pH inicial de los caldos de 20 mL de YPG para compararlo con el pH final, realizando esta última medición luego de la primera incubación de las cepas, mediante tiras reactivas de pH.

#### **4.12. Simulación del ambiente gástrico.**

Es una prueba clave, ampliamente utilizada para poner de manifiesto la capacidad probiótica de una cepa, teniendo en cuenta varios de los parámetros más importantes que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos en el estómago del monogástrico (Ortiz *et al.*, 2008).

#### **4.13. Procedimiento**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito para los parámetros anteriores, con la particularidad de que el medio YPG contenido en los frascos de 20 mL se modificó incorporando pepsina (3 g/l), NaCl (5 g/l) y HCl 1N para ajustar el pH a 2, característico del estómago del monogástrico. Por otra parte, también se realizó para todas las cepas un tratamiento control, conservando las variables intactas a excepción del pH, que se mantuvo en un valor de 7.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Análisis estadístico y discusión a partir de las determinaciones microbiológicas de los tratamientos temperatura, pH y simulación gástrica.

### 5.1. Resistencia a la temperatura.

**Tabla 4.** Recuento de UFC/g de intestino para cada cepa de *Saccharomyces* spp.

Cepas	Medias	E.E.	P
AN58*	*6,78 cde	0,23	0,01
LC	7,40 abc		
O21	6,97 bcde		
O22	6,65 de		
O32	7,18 bcd		
P+032	7,69 a		
P+041	7,56 ab		
P+O11	7,00 bcde		
P+O42	7,67 a		
P32	6,51 e		
P42	6,97 bcde		
P43	7,39 abc		
PB113	7,29 abcd		
S7*	7,42 abc		
T41	7,08 abcde		
TB4B	6,63 de		

\*Letras diferentes indican resultados significativamente distintos ( $p > 0,05$ ). Valores medios mayores se indican en color rojo. Resultados del Test LSD Fisher, expresados en  $n \log_{10}$ .

**Tabla 5.** Estudio estadístico de los resultados obtenidos a distintas temperaturas.

T(°C)	Medias	E.E.	P
28	*7,32 b	0,1	0,0001
36	7,36 b		
41	6,73 a		

\*Letras diferentes indican resultados significativamente distintos ( $p > 0,05$ ). Resultados del Test LSD Fisher, expresados en  $n \log_{10}$ .

Como puede observarse en la **Tabla 5**, no hubo diferencias significativas entre los resultados de las temperaturas 28°C y 36°C, tomando valores dentro del rango entre 7 y 8  $\log_{10}$ .

Todas las cepas *Saccharomyces* estudiadas se desarrollaron eficientemente a los 36 °C ( $p < 0,0001$ ), alcanzando un valor de 7,36  $\log_{10}$ , siendo resistentes también a las

restantes temperaturas. Las evaluaciones realizadas con la temperatura de 41°C demostraron que se producen cambios en la forma de desarrollo de los cultivos, y se evidenció la menor resistencia.

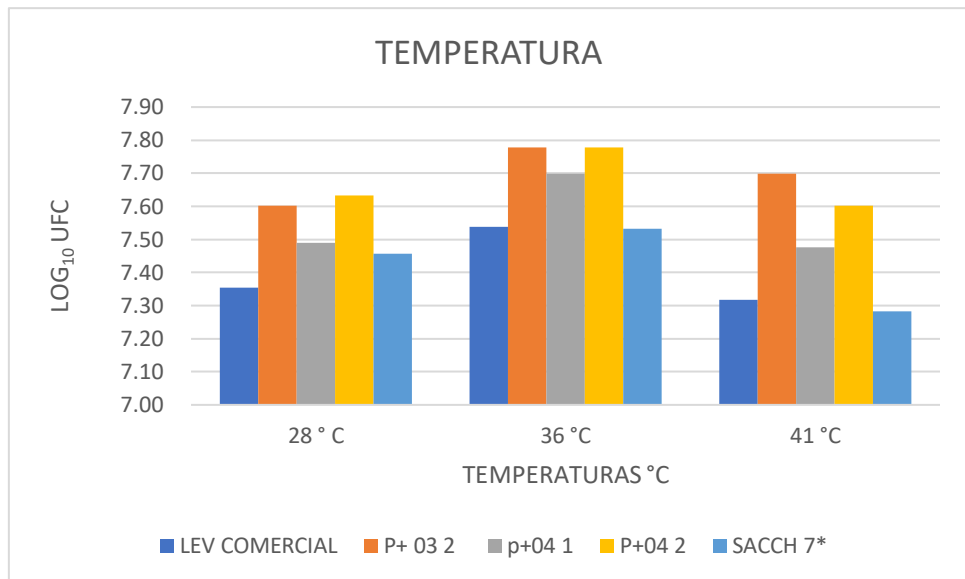
Resultados similares fueron obtenidos en investigaciones llevadas a cabo por Mantilla y col. (2012), donde demuestran que *Saccharomyces* spp. aisladas de heces de aves y sometidas a tres temperaturas distintas (28 °C, 37 °C y 42 °C) tienen su óptimo de crecimiento a los 37°C y disminuyen notablemente el desarrollo cuando se las expuso a 41°C.

El 100% de las cepas de *Saccharomyces* siguió la misma tendencia y resistieron a los tratamientos realizados ( $p < 0,01$ ).

Los pollos de engorde son homeotermos, es decir, son capaces de autorregular su temperatura corporal. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la misma varía con el clima, y para que sus órganos vitales funcionen normalmente, deben mantener la temperatura corporal interna cerca de los 41 °C (Requena y col., 2004). Por dicho motivo, se estudió cómo reaccionan las cepas nativas de *Saccharomyces* frente a valores extremos de temperatura.

Según Magidan *et al.*, (2004) la temperatura, es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. El rango óptimo para el desarrollo varía entre los diferentes géneros de levaduras, pero a medida que se eleva, las reacciones químicas y enzimáticas son más rápidas y el crecimiento se acelera, hasta el punto en que tienen lugar las reacciones de inactivación.

Uno de los motivos por los que se puede explicar el menor crecimiento de las cepas O22 y P32 a 41°C, sería la desnaturalización de las proteínas, reflejada en los coágulos formados en la superficie del caldo YPG.



**Figura 3.** Recuento de UFC/g de intestino de las cepas nativas que mejor se adaptaron a los distintos valores de temperatura, expresado como  $n \log_{10}$ .

## 5.2. Tolerancia al cambio de pH.

**Tabla 6.** Resultados obtenidos según estudios estadísticos.

Cepas	Medias	E.E.	P
AN58*	*7,30 ab	0,17	0,7799
LC	7,33 ab		
O21	7,18 ab		
O22	7,32 ab		
O32	7,06 ab		
P+032	7,33 ab		
P+041	7,43 ab		
P+O11	7,43 ab		
P+O42	7,52 a		
P32	7,42 ab		
P42	7,31 ab		
P43	7,00 b		
PB113	7,29 ab		
S7*	7,37 ab		
T41	7,38 ab		
TB4B	7,21 ab		

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Los valores medios más altos del experimento fueron citados de color rojo. Resultados del Test LSD Fisher, expresados en  $n \log_{10}$ .

**Tabla 6.** Estudio estadístico de los resultados obtenidos a distintos valores de pH.

pH	Medias	E.E.	P
4	7,15 b	0,07	0,0249
6	7,44 a		
7	*7,33 ab		

\*Letras diferentes indican resultados significativamente distintos ( $p > 0,05$ ). Resultados del Test LSD Fisher, expresados en  $n \log_{10}$ .

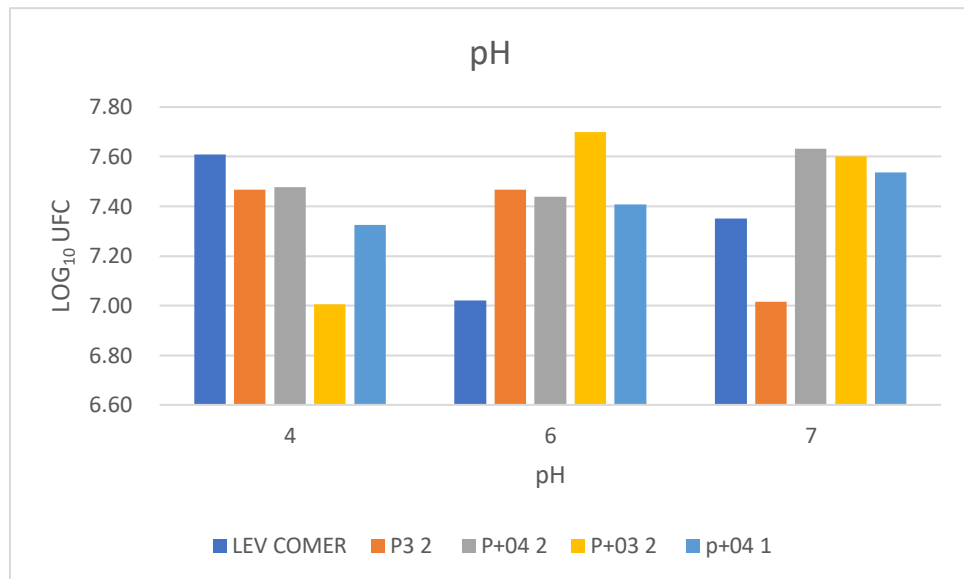
En este caso, se observaron diferencias significativas entre los valores de UFC/g de intestino estudiados en el tratamiento a pH 4 ( $7,15 \log_{10}$ ) en relación al pH 6 y 7 ( $p < 0,0249$ ). El recuento en placa de las 16 cepas estudiadas fue menor cuando fueron expuestas al valor más bajo de pH.

Como puede observarse en la Figura 4, la mayor resistencia se determinó a pH 6. Esto sucedió en el 87,5% de las *Saccharomyces* analizadas, ya que el desarrollo de la cepa utilizada como control fue mayor en el pH 4, y de O32 en el pH 7.

Resultados similares se observaron con cepas nativas de *Saccharomyces* spp. aisladas de las heces de pollos asilvestrados (*Gallus gallus*) (Lara Mantilla y col., 2012), que crecieron eficientemente a pH 6.

La resistencia a bajos valores de pH y a las sales biliares es de gran importancia en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos en el tracto gastrointestinal, por lo que se considera como prerrequisito para evaluar a las posibles cepas probióticas. Sus efectos han sido investigados por diferentes autores (Floch *et al.*, 1972; Tannock *et al.*, 1989; Dunne, 2001; Tsai *et al.*, 2005), como pasos obligatorios para la selección de las mismas.

La capacidad de soportar diferentes rangos de pH ha sido demostrada por Pso-*mas et al.* (2001) en combinación con la aptitud de crecer en 37 °C, asegurando que éstos son criterios de selección para la evaluación del potencial probiótico de las cepas.



**Figura 4.** Recuento de UFC/g de intestino de las cepas nativas que mejor se adaptaron a los distintos valores de pH, expresado como  $n \log_{10}$ .

En relación a este tratamiento, otra evaluación interesante fue la determinación pH del medio luego de la incubación de las levaduras, ya que su disminución está relacionada con la capacidad de crecimiento de la cepa (a mayor población, mayor cantidad de ácidos orgánicos producidos), en detrimento del desarrollo de ciertos microorganismos indeseables. Por esta razón, se estableció como criterio de selección, evaluar las cepas que disminuyeron el pH del medio a menos de 5,5 en 24 hs (Tannok, 1999).

Todos los resultados obtenidos se situaron entre 5 y 5,5.

Valores similares se obtuvieron con cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas del tracto gastrointestinal de pollos (Rondón *et al.*, 2008).

De manera similar, Martínez y col. (2006) determinaron que, tras la evaluación de un hidrolizado de crema de levadura, usando la especie *Saccharomyces cerevisiae* en pollas, encontraron menor cantidad de patógenos, como consecuencia del aumento de los niveles de los ácidos orgánicos y su grado de disociación.



### 5.3. Supervivencia frente a un ambiente gástrico *in vitro*.

**Tabla 7.** Estudio estadístico de los resultados obtenidos a distintos valores de pH en el tratamiento.

Cepas	Medias	E.E.	P
AN58*	5,97 a	0,7	0,105
LC	7,13 a		
O21	6,86 a		
O22	7,28 a		
O32	7,05 a		
P+032	7,56 a		
P+041	7,56 a		
P+O11	7,38 a		
P+O42	7,35 a		
P32	6,30 a		
P42	7,22 a		
P43	*5,77 ab		
PB113	3,76 b		
S7*	6,38 a		
T41	6,44 a		

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Los valores medios más altos del experimento fueron citados de color rojo.

**Tabla 8.** Estudio estadístico de los resultados: Análisis de varianza por el Test LSD Fisher

pH	Medias	E.E.	P
2	*6,14 a	0,26	0,0118
7	7,19 b		

\*Letras diferentes indican resultados significativamente distintos ( $p > 0,05$ ). Resultados del Test LSD Fisher, expresados en  $n \log_{10}$ .

La **Tabla 9** muestra una disminución representativa del número de colonias al exponerlas a pH 2, en comparación al control, que contaba con las mismas concentraciones de pepsina y NaCl, pero con un pH 7. Los resultados entre tratamientos fueron significativamente diferentes ( $p < 0,0118$ ).

Los resultados para el 80% de las *Saccharomyces* estudiadas fueron estadísticamente similares, tomando valores desde 5,5 hasta 7,5. La cepa “**PB113**” no presentó desarrollo evidente en respuesta al tratamiento evaluado ( $p < 0,1050$ ).

Aportes realizados por Mantilla (2012) determinaron que las levaduras son relativamente insensibles a las variaciones en la presión osmótica, y se adaptan a cambios

fuertes en la concentración de solutos del medio, porque poseen una pared celular mecánicamente rígida.

Por otro lado, en el tratamiento control se demostró que el 100% de las cepas son capaces de soportar las concentraciones normales de pepsina del estómago de un monogástrico, quedando en evidencia que lo que más afecta a este tipo de microorganismos son los rangos de pH, que deben ser neutros para obtener el desarrollo potencial de las mismas. Estas tendencias coinciden con las registradas anteriormente en el análisis de la exposición de *Saccharomyces* a diferentes valores de pH, ya que en el 87,5% de las cepas se determinó el mayor desarrollo a pH 6.

Además, se puede observar claramente una desventaja para la cepa comercial frente a las 14 cepas nativas investigadas. Aunque todas toleraron valores de pH 2, éstas últimas presentaron mayor resistencia a dicha condición, probablemente por el origen de las cepas, es decir, al haber sido aisladas del intestino y que el pollo las haya consumido espontáneamente (por provenir del alimento, del agua, o de alguna fuente que lo rodeara) están mejor adaptadas.

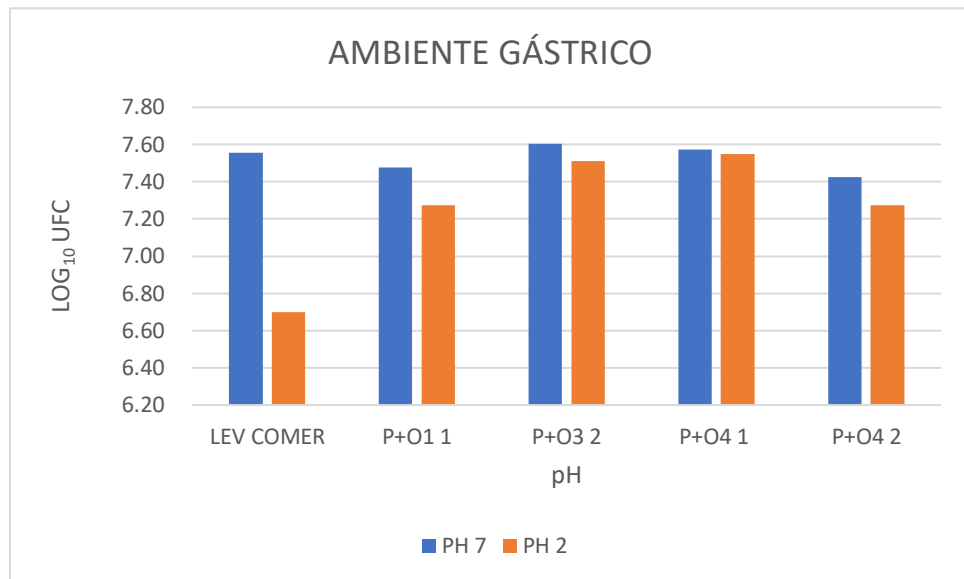
Los resultados son comparables con el estudio llevado a cabo por Ortiz (2008) en el que se observó un mayor crecimiento de *S. cerevisiae* aislada de melaza de caña con respecto a una comercial seleccionada utilizada como referencia.

El jugo gástrico secretado tiene un pH de 2, concentración de sales de 0.5% (p/v) y enzimas catabólicas (Martins *et al.*, 2005).

Según Tannock y Walter (1998), la mayor dificultad que presentan los probióticos utilizados radica en su baja capacidad de supervivencia durante su paso por el estómago y el duodeno. Para lograr un efecto positivo de estos microorganismos sobre la flora intestinal es esencial que sean capaces de adaptarse en el intestino y competir con la flora nativa existente.

En el caso de la levadura, la tolerancia al ácido puede deberse a la presencia de proteínas especializadas que catalizan el intercambio de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ) e  $\text{H}^+$  a través de las membranas, regulando sus concentraciones y el pH a nivel citoplasmático y de organelas (Mitsui *et al.*, 2005; Ohgaki *et al.*, 2005). Otro de los posibles mecanismos de regulación es a través de la ATPasa, localizada en la membrana citoplas-

mática. Esta puede crear un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos y que está implicado en el mantenimiento del pH cercano a la neutralidad (Viegas *et al.*, 1998; Sychrova *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Recuento de UFC/g de intestino de las cepas nativas que se desarrollaron mejor en los distintos valores de pH, expresado como  $n \log_{10}$ .

#### 5.4. Acción inhibitoria *in vitro* de los diferentes factores estudiados frente a las cepas de *Saccharomyces* spp.

En base a las mediciones, se elaboraron tablas para una mejor interpretación de los resultados.

**Tabla 9.** Rangos de capacidad inhibitoria de las distintas variables sobre las cepas seleccionadas.

Inhibición (n log <sub>10</sub> UFC)	Capacidad inhibitoria
7,5-8	NULA (-)
7-7,5	BAJA (B)
6,5-7	MODERADA (M)
6-6,5	ALTA (A)
<6	MUY ALTA (MA)

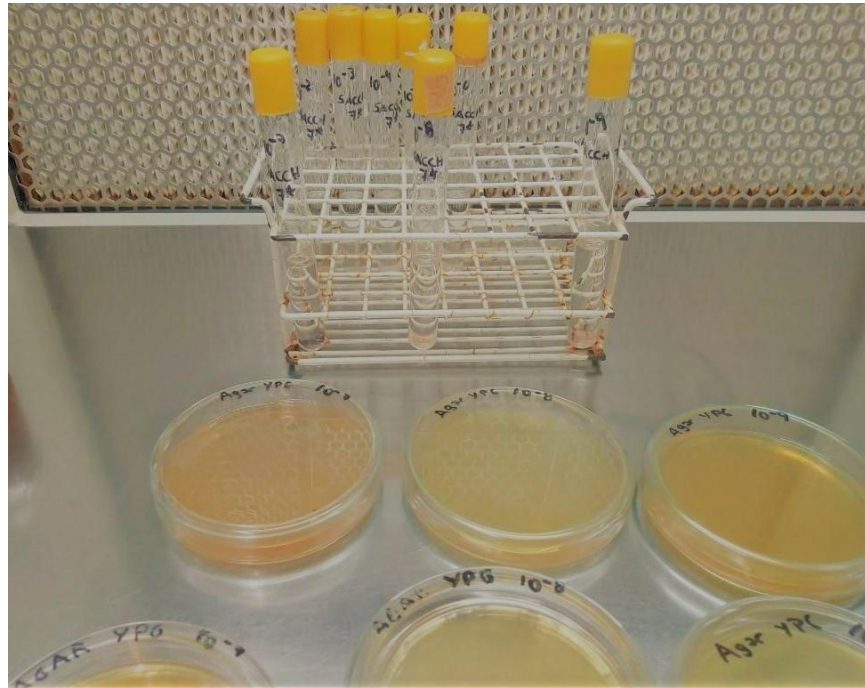
**Tabla 10.** Inhibición producida por las diferentes variables sobre el desarrollo de cepas de *Saccharomyces* seleccionadas.

Cepas	28°C	36°C	42°C	pH 4	pH 6	pH 7	AGpH 7	AGpH 2
AN58*	B	B	MA	B	-	B	M	MA
LC	B	-	B	-	B	B	-	M
O21	B	B	A	M	B	B	B	M
O22	B	B	MA	B	-	B	B	B
O32	B	B	M	B	M	B	B	M
P+032	-	-	-	B	-	B	-	-
P+041	B	B	B	B	B	-	-	-
P+O11	B	B	M	B	-	-	B	B
P+O42	-	-	-	B	B	-	B	B
P32	B	A	A	B	-	B	B	MA
P42	B	-	MA	B	-	B	B	B
P43	B	-	B	A	B	B	M	MA
PB113	B	B	M	B	B	B	M	MA
S7*	B	-	B	B	B	B	B	MA
T41	B	B	M	B	B	B	M	A

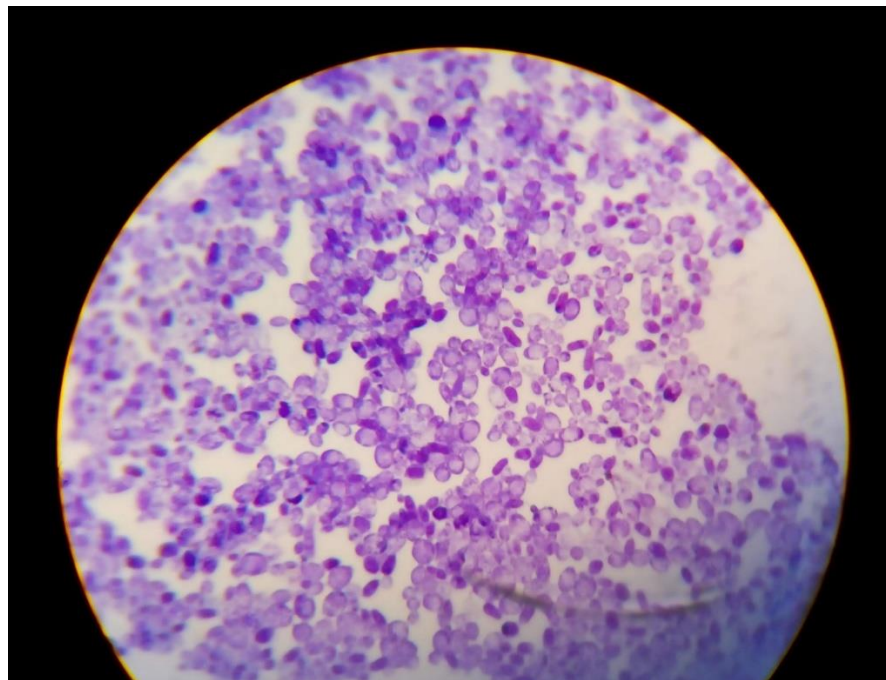
## 6. CONCLUSIONES

- La versatilidad metabólica que presenta *Saccharomyces*, por ser un microorganismo eucariótico, permitió que las cepas estudiadas desarrollaran a temperatura de 41°C (T° corporal del pollo), cuando la temperatura óptima de crecimiento es 36°C.
- Asimismo, las cepas nativas de *Saccharomyces* mostraron capacidad para desarrollar a pH 2, aunque su rango óptimo se ubicó cercano a la neutralidad.
- El factor que más influye en la supervivencia de las *Saccharomyces*, es el pH del medio de cultivo, y definirá su supervivencia hasta el final del tracto gastrointestinal.
- Del total de cepas investigadas, P+O41 y P+O42 resultaron las que toleraron todas las condiciones gastrointestinales evaluadas (pH ácido, altas temperaturas, y determinadas concentraciones de sales y enzimas digestivas).
- P+O41 y P+O42 tuvieron mayor plasticidad que la cepa utilizada como control, patentada comercialmente con propiedades probióticas óptimas.
- Se requiere complementar los estudios *in vitro* con la investigación de otros parámetros, además de estudios *in vivo* para validar los efectos benéficos y determinar su posible selección como producto probiótico.

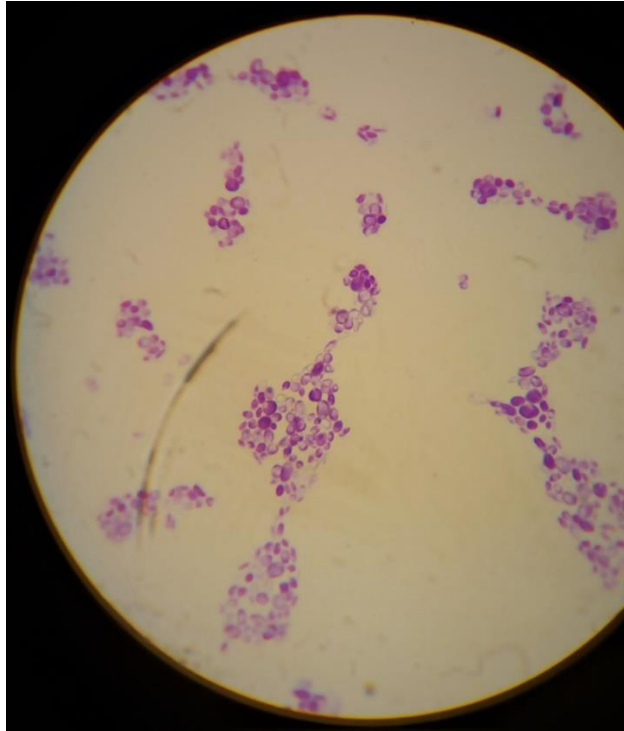
## 7. ANEXO



**Figura 6.** Flujo laminar nivel 2, Departamento de Agronomía. Materiales de trabajo. Diluciones decimales previas a la siembra en Caja de Petri.



**Figura 7.** Tinción simple, bajo el microscopio, perteneciente a la cepa levadura comercial.



**Figura 8.** Tinción simple, bajo el microscopio, de la cepa P+041.



**Figura 9.** Proceso de comparación de turbidez con escala McFarland, para determinar la concentración inicial de microorganismos en caldo YPG.





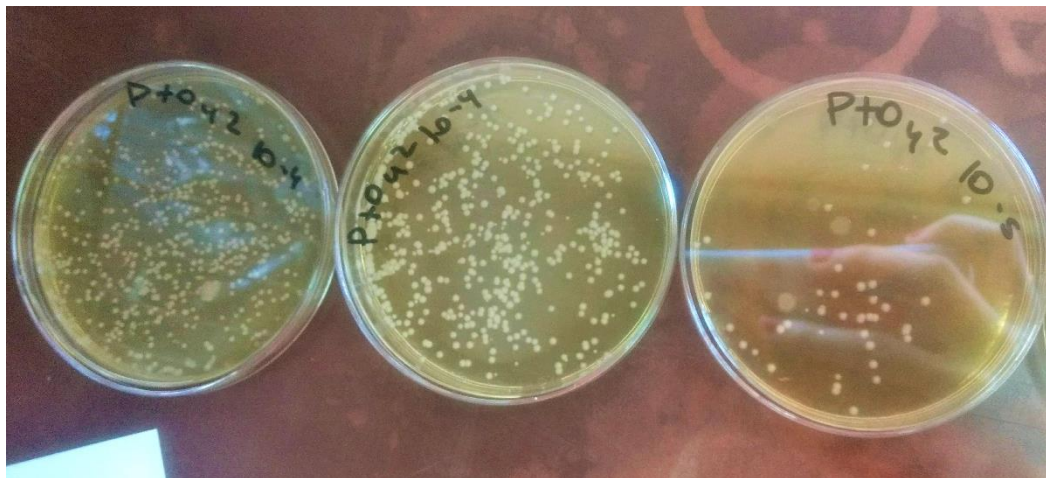
**Figura 10.** Cambio de aspecto del caldo YPG, luego de la primera incubación de la levadura (a la izquierda: control).



**Figura 11.** Dos de las cepas que no obtuvieron potencial desarrollo luego del tratamiento a 41 °C. Se evidencia la coagulación de las proteínas sobre la superficie del caldo.



**Figura 12.** Recuento en placa de la cepa comercial, en Caja de Petri, con sus respectivas diluciones y repeticiones, luego del tratamiento con pepsina.



**Figura 13.** Recuento en placa de la cepa P+04 2, en Caja de Petri, con sus respectivas diluciones y repeticiones, luego del tratamiento con pepsina.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

Agroindustria. 2018. Anuario avícola. Disponible en: [https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/\\_archivos/000080\\_Nro%2080%20Abril%202018%20\(Anuario%202018\).pdf](https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/_archivos/000080_Nro%2080%20Abril%202018%20(Anuario%202018).pdf)

ANMAT. Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>

Arana I., Orruño M., Barcina I. Cómo abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Disponible en: [https://ocw.ehu.es/pluginfile.php/1665/mod\\_resource/content/1/Bibliografia.pdf](https://ocw.ehu.es/pluginfile.php/1665/mod_resource/content/1/Bibliografia.pdf)

Arenaz F., Salerno C.M., Fernández H., Rodríguez Ganduglia H., Pérez M. 2013. Monitoreo de Enterobacterias en carcasas de pollos parrilleros. VI Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Mar del Plata.

Ashayerizadeh O., Dastar B., Shams Shargh M., Ashayerizadeh A., Mamooee M. 2009. Influence of antibiotic, prebiotic and probiotic supplementation to diets on carcass characteristics, hematological indices and internal organ size of young broiler chickens. *Journal of animal and veterinary advances*. Vol 8. No. 9. Pp. 1772-1776. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4823295/>

Bezoen A., Hanekamp J.C., Van Haren W. 1999. Emergence of a Debate: AGPs and Public Health. Disponible en: <http://groenerekenkamer.nl/grkfiles/images/AGPs.pdf>

Bisigniano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. 1999. On the in-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. Disponible en: <https://eurekamag.com/pdf/003/003219352.pdf>

Blekas G., Vassilakis C., Harizanis C., Tsimidou M., Boskou D. 2002. Biophenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pp.3688–3692. file:///C:/Users/santi/Downloads/jf0115138.pdf

Briante R., La Cara F., Tonziello M.P., Febbraio F., Nucci R. 2001. Antioxidant Activity of the Main Bioactive Derivatives from Oleuropein Hydrolysis by Hyperthermophilic  $\alpha$ -Glycosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pp. 3198–3203.

Butzby J.C., Roberts T., Lin J.C., MacDonald, J.M. 1996. Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses. Disponible en: [https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/40722/28370\\_aer741a\\_1\\_.pdf?v=41063](https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/40722/28370_aer741a_1_.pdf?v=41063)

Couto A., Salerno C. M. 2017. Tesis: Uso de harina de chía e hidroxitirosol en dietas de pollos parrilleros. Impacto en la ecobiota microbiana de las excretas. Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires, Argentina. En prensa.

Corona Lisboa J.L. 2012. Impacto del estrés calórico en la producción de pollos de engorde de Venezuela. Revista electrónica veterinaria, REDVET. Vol. 13. No. 6. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvetn060612.html>

Díaz López E.A., Ángel Isaza J., Ángel D. 2017. Probióticos en la avicultura: una revisión. Revista De Medicina Veterinaria. No. 35. Pp.175-189. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n35/0122-9354-rmv-35-00175.pdf>

Di Masso R.J., Dottavio A.M. 2010. Mejoramiento avícola para sistemas productivos semi-intensivos que preservan el bienestar animal. Journal of Basic and Applied Genetics. Vol.21. No.2. Art. 12.

Dos Santos T., Varavallo M. 2011. A importancia de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. Revista científica do ITPAC. Vol 4. No 1. Disponible en: <http://www.ltpac.br/revista>

Fernández H.T., Morales M., Amela M.I., Salerno C.M., Rodríguez Ganduglia H., Arenaz F., Zamponi A.M. 2014. Efectos de la adición de probiótico (*Bacillus subtilis*) y omega 3 (*Salvia hispanica* L.) sobre los parámetros sanguíneos en pollos parrilleros.

Furneri P.M., Piperno A., Sajia A., Bisignano G. 2004. Antimycoplasmal Activity of Hydroxytyrosol. American Society for Microbiology. Vol. 48, No. 12. Pp. 4892–4894.

Frandsen, R.D. y Spurgeon, T.L. 1996. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos, 5 a Edición. Ciudad de México, México: Editorial Interamericana. Pp.560.

Galli G., Visioli F. 1999. Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olives/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean Diet. University of Milan. Institute of Pharmacological Sciences. Pp. 523-526.

Gaskin J.M., Wilson H.R., Mather F.B., Jacob J.p., Garcia J.C. 2001. Enfermedades de las Aves Transmisibles a los Humanos. Disponible en:<http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/16/18/00001/AN09900.pdf>

Guía de Sistemas de Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (VETA) y la Investigación de Brotes. Costa Rica. 2001. Disponible en: <https://www.as-sal.gov.ar/assa/userfiles/file/guia%20veta.pdf>

Gutiérrez Ramírez L.A., Montoya O.I., Vélez Zea J.M. 2013. Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Vol.8. No.1. Pp.135-146. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/pmL/v8n1/v8n1a10.pdf>

Hernansaez Meoro P. 1962. Clave dicotómica para la determinación de géneros de levaduras. Repositorio Institucional de la Universidad de Murcia. Vol. 21. No. 3.4. Curso 1962-63.

Iji P.A. 1999. The impact of cereal non-starch polysaccharides on intestinal development and function in broiler chickens. World's Poultry Science Journal. Vol.55. Pp. 375-387.

Jae-Suk C., Nam-Hee P., Seon.Yeong H., Jae Hak S., Inseok K., Kwang Keun C., Soon C. 2013. The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. Disponible en: [http://jeb.co.in/journal\\_issues/201307\\_jul13/paper\\_02.pdf](http://jeb.co.in/journal_issues/201307_jul13/paper_02.pdf)

Kroll D. 2016. Test de recuento heterotrófico en placas. Disponible en: <https://es.hach.com/asset-get.download.jsa?id=50927472116>

Lavinia S., Drinceanu D., Corcionivoschi N., Julean C., Stef D., Mot D., Simiz E. 2009. The effect of dietary non-starch polysaccharides on the intestinal viscosity and on the cecal microflora of broiler fed with various protein sources. Disponible en: <https://www.ibna.ro/arhiva/AZ%2012-3/AZ%2012-3%2003%20Stef.pdf>

Jácome L., Hernández M., Castro C., Peña S., González, G., Franco R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Vol. 3, No. 1. Pp. 10 18. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>

Mantilla C., Burgos A. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 14. No. 1. Pp. 31-40. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081004>

Mantovani H., Braga Arcuri P. Recentes avanços em microbiologia ruminal e intestinal. Biotecnologias para a nutrição de ruminantes. Disponible en: <https://www.re->

searchgate.net/publication/267792984\_RECEN-  
TES\_AVANCOS\_EM\_MICROBIOLO-  
GIA\_RUMINAL\_E\_INTESTINAL\_BIOTECNOLOGIAS\_PARA\_A\_NUTRICA-  
O\_DE\_RUMINAN-  
TES

McDonald D.E., Pethick D.W., Mullan B.P., Hampson D.J. 2001. Increasing viscos-  
ity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and  
stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. Dispo-  
nible en: [https://pdfs.semanticscho-  
lar.org/6140/6b427dd29d68a560390286003fc9201fcd17.pdf?\\_ga=2.75622613.178997  
2754.1541539810-826706129.1540846805](https://pdfs.semanticscholar.org/6140/6b427dd29d68a560390286003fc9201fcd17.pdf?_ga=2.75622613.1789972754.1541539810-826706129.1540846805)

Medina-Martínez M.S., Truchado P., Castro-Ibáñez I., Allende A. 2015. Antimicro-  
bial activity of hydroxytyrosol: a current controversy. Disponible en:  
[https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09168451.2015.1116924?needAc-  
cess=true](https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09168451.2015.1116924?needAccess=true)

Mesmin L., Livrelli V., Privat M., Denis S., Cardot J., Alric M., Blanquet-Diot S.  
2011. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Esche-  
richia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. Vol. 77. No. 3. Pp. 1127-1131.  
Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028742/?report=clas-  
sic](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028742/?report=classic)

Morales Vallecilla, C.A. 2014. Fisiología digestiva de monogástricos. Disponi-  
ble en: <http://www.gaingon.net/pdf2016/851531428602221.pdf>

Odóñez Salazar F. 2011. Evaluación de un probiótico, un acidificante y un anti-  
biótico en la producción de pollos broiler. Tesina de grado. Disponible en:  
[https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5419/1/EVA-  
LUACI%c3%93N%20DE%20UN%20PROBI%c3%93TICO%2c%20UN%20ACIDIFI-  
CANTE%20Y%20UN.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5419/1/EVALUACION_DE_UN_PROBIOTICO_UN_ACIDIFICANTE_Y_UN_ANTI-BIOTICO_EN_LA_PRODUCION_DE_POLLOS_BROILER.pdf)

Ohimain E.I., Ofongo R. 2012. The effect of probiotic and prebiotic feed supple-  
mentation on chicken health and gut microflora. Disponible en: [https://www.resear-  
chgate.net/publication/303722284\\_The\\_Effect\\_of\\_Probiotic\\_and\\_Prebio-  
tic\\_Feed\\_Supplementation\\_on\\_Chicken\\_Health\\_and\\_Gut\\_Microflora\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/303722284_The_Effect_of_Probiotic_and_Prebiotic_Feed_Supplementation_on_Chicken_Health_and_Gut_Microflora_A_Review)

Ortiz A., Reuto J., Fajardo E., Sarmiento S., Aguirre A., Arbeláez G., Gómez D.,  
Quevedo-Hidalgo B. 2008. Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa

nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas scientiarum*. Vol. 13. No. 2. Pp. 38-148. Disponible en: [www.javeriana.edu.co/universitas\\_scientiarum](http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum)

Patterson J.A., Burkholder K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12710484>

Redón Miralles M.A. 2010. Estudio Global del Metabolismo Lipídico de *Saccharomyces* spp. en fermentaciones a baja temperatura. Cap. III. Efectos de la suplementación lipídica sobre la composición lipídica y capacidad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* a bajas temperaturas. Tesis doctoral. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Jose\\_Guillamon/publication/225400648\\_Effect\\_of\\_lipid\\_supplementation\\_upon\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_lipid\\_composition\\_and\\_fermentation\\_performance/links/0c960530c7c062d17b000000/Effect-of-lipid-supplementation-upon-Saccharomyces-cerevisiae-lipid-composition-and-fermentation-performance.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jose_Guillamon/publication/225400648_Effect_of_lipid_supplementation_upon_Saccharomyces_cerevisiae_lipid_composition_and_fermentation_performance/links/0c960530c7c062d17b000000/Effect-of-lipid-supplementation-upon-Saccharomyces-cerevisiae-lipid-composition-and-fermentation-performance.pdf)

Robertson W., Brooks T. The role of HPC in managing the treatment and distribution of drinking-water. 2003. Disponible en: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/HPCFull.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/HPCFull.pdf)

Rondón A., Samaniego L., Bocourt R., Rogriguez S., Milián G., Ranilla M., Laurencio M., Pérez M. 2008. Aislamiento, identificación y caracterización de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *CYTA-Journal of Food*. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358120809487628>

San Martón A., Almeida P., Léo V., Fernández H. 2017. Estrés calórico en producción de pollos parrilleros. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Disponible en: <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1682/SAN%20MARTIN,%20AGUSTINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rubio M., Hernández E., Aguirre R., Poutou P. 2008. Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*. Vol. 13. No. 1. Pp. 1157-1169. Disponible en: <http://redalyc.org/articulo.oa?id=69313107>

Santos Martins F., Flaviano B., Flávio H., Penna F., Rosa C., Drummond N; Regina M., Neves M., Nicoli J. 2005. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. *Revista de biología e ciências da terra*. Vol. 5. No 2. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050217>

Segura J., Olivares A., Lopez Bote C. 2013. Probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición porcina. Departamento de Nutrición animal, UCM. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4385520>

SENASA. 2018. Aves Exportación/Importación. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/files/poll1804xls>

Serra A.T., Matías A.A., Numes A.V., Leitao M.C., Brito D., Bronze R., Silva S., Pires A., Crespo M.T., San Romao M.V., Duarte C.M. 2007. In vitro evaluation of olive-and graped-based natural extracts as potential preservatives for food. Innovative Food Science and Emerging Technologies. Disponible en: [https://eclass.teicrete.gr/modules/document/file.php/GF104/ASKHSH%20ENTOPISMOY%20EPISTHMONI-KHS%20PLHROFORIAS%20KAI%20ANALYSHS%20THS-26-10-2012/BIBLIOGRAFIA%20GIA%20THN%20ASKHSH/Serra\\_ETAL\\_2008\\_Innov%20Food%20Sci%20Emerging%20Techn\\_In%20vitro%20evaluation%20of%20olive%E2%80%93and%20grape%E2%80%93based%20natural%20extracts%20as%20potential%20preservatives%20for%20food.pdf](https://eclass.teicrete.gr/modules/document/file.php/GF104/ASKHSH%20ENTOPISMOY%20EPISTHMONI-KHS%20PLHROFORIAS%20KAI%20ANALYSHS%20THS-26-10-2012/BIBLIOGRAFIA%20GIA%20THN%20ASKHSH/Serra_ETAL_2008_Innov%20Food%20Sci%20Emerging%20Techn_In%20vitro%20evaluation%20of%20olive%E2%80%93and%20grape%E2%80%93based%20natural%20extracts%20as%20potential%20preservatives%20for%20food.pdf)

Zhang A.W., Lee B.D., Lee S.K., Lee K.W., An G.H., Song K.B., Lee C.H. 2005. Metabolism and nutrition: Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. Poultry science. Vol. 84. Pp. 1015-1021. Disponible en: <http://ps.oxfordjournals.org>