



Universidad Nacional del Sur

Departamento de Agronomía



**USO DE HARINA DE CHÍA E HIDROXITIRO SOL EN  
POLLOS PARRILLEROS.  
DINÁMICA MICROBIANA DE LAS EXCRETAS.**



**Trabajo de Intensificación para optar el título de Ingeniera  
Agrónoma**

**ALUMNO:** Couto, Ana María

**TUTOR:** Salerno, Carmen Matilde

**CONSEJEROS:** Fernández, Hebe Tania

Piñeiro, Verónica

**DICIEMBRE 2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por creer en mí y darme la posibilidad de estudiar, acompañándome siempre.

A mis hermanos, por alentarme y apoyarme a transitar este camino.

A Hugo, por ser mi compañero incondicional.

A la familia Anriques, por ser mi segunda familia y estar siempre conmigo.

A Manu, mi amiga y compañera de estudio.

A mis amigas, por su compañía y el gran afecto que me brindaron.

A Carmen Salerno, excelente profesora y persona a la cual admiro.

A María Inés Amela y Hebe Fernández, por su buena predisposición y apoyo.

A Miguel Alvarado, por su amistad y generosidad en todo momento.

A la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Agronomía, por contribuir en mi formación académica.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
Perspectiva mundial para la Avicultura	5
Avicultura en Argentina	5
Alimentación en aves	5
Aditivos en la alimentación aviar	6
Chía ( <i>Salvia hispanica L.</i> )	6
Harina de chía	7
Hidroxitirosol	8
Impacto de la dieta en la microflora intestinal	9
Excretas	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
Hipótesis	11
Objetivos	11
Objetivos generales	11
Objetivos específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Alojamiento	12
Cría y manejo	12
Sanidad	12
Dietas experimentales	13
Provisión de agua	15
Muestreo	15
Procesamiento de las muestras	16
Análisis microbiológicos	16
Recuento de bacterias heterótrofas en placa (RHP)	16
Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF)	16
Pseudomonas	17
Levaduras	17
Análisis fisicoquímicos	17
Conductividad eléctrica	18
pH	18
Nitrógeno amoniacal	18
Porcentaje de humedad	18
Sólidos totales	18
Respiración	18
Fósforo total	18

Ca y Mg	18
Análisis estadístico	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
Recuento de bacterias heterótrofas en placa (RHP)	20
Comportamiento de Coliformes totales (CT), fecales (CF) y <i>Pseudomonas</i> spp. en los tratamientos con Harina de chía, de forma individual y combinada	21
Coliformes fecales (CF) en el tratamiento con Hidroxitirosol	24
Levaduras	24
Análisis físico-químicos	25
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

# INTRODUCCIÓN

## **Perspectiva mundial para la Avicultura**

El consumo mundial de productos avícolas, especialmente de carne, ha experimentado un crecimiento continuo en los últimos años, una tendencia que se predice continuará. Para el año 2020 se calcula que representará el 36% de la producción cárnica a nivel global, con un posible incremento del 3% anual (USDA, 2018).

El crecimiento de la industria avícola está ejerciendo un profundo efecto en la demanda de alimentos animales y materias primas, contribuyendo así, a continuar aumentando el consumo, que se reafirma más con el incremento demográfico y la urbanización de las regiones en desarrollo.

## **Avicultura en Argentina**

La avicultura en Argentina es una de las actividades más importantes del sector agropecuario. En los últimos años, la producción de carne aviar se encuentra ocupando el segundo lugar después de la carne porcina.

Durante la última década, la demanda interna de carne de pollo creció un 32.4% pasando de 33 kg/hab/año a 43.7 kg/hab/año (USDA, 2018). El incremento en el consumo está fundamentado en una tendencia hacia productos saludables e inocuos y la búsqueda de estrategias nutricionales que permitan una alimentación con un bajo contenido calórico y graso. La carne de pollo, en este sentido, cumple con los requisitos exigidos por los consumidores, siendo fuente de proteína asequible, con predominio de grasas insaturadas y una proporción adecuada de sodio, hierro y fósforo.

El estatus sanitario de Argentina es excelente y esto no solo permite asegurar la calidad del producto en el mercado interno sino también acceder a los mercados externos. Además, la inversión entre los actores nacionales en una mayor integración vertical, ha resultado en una modernización de las plantas y equipos que está produciendo ganancias en la eficiencia, calidad, estandarización y mayor trazabilidad del producto (USDA, 2018).

Los cuatro pilares fundamentales sobre los que se sostiene la producción avícola industrial son: genética, sanidad, manejo y alimentación. Estos factores permiten lograr alta productividad, reduciendo costos y facilitando así, una mayor accesibilidad al producto.

## **Alimentación en aves**

La alimentación cumple un rol muy importante cuando se quiere lograr máximos rendimientos, así como también asegurar el desarrollo óptimo de las aves. La elección

de la dieta implica, proporcionar los nutrientes adecuados a los requerimientos de los animales, es por ello que no solo brindan energía y proteína, sino también suplementos y aditivos que influyen en el bienestar de los pollos.

### **Aditivos en la alimentación aviar**

Un aditivo alimentario se refiere a un producto agregado en la formulación a un nivel bajo de inclusión, cuyo propósito es incrementar la calidad nutricional del alimento, el bienestar y la salud del animal (Ravindran, 2010).

Una práctica ampliamente difundida a nivel global fue la adición de antibióticos en la alimentación de las aves. La capacidad que poseían las dosis bajas de antibióticos para promover el crecimiento de pollos fue descubierta por casualidad en la década de 1940 (Gustafson & Bowen, 1997).

Con el tiempo esta práctica comenzó a ser cuestionada desde el punto de vista de la salud pública por sus implicancias en la generación de resistencia a los antimicrobianos usados en terapéutica (Ardoino *et al.*, 2017). Es por ello que en 1985 Suecia prohibió el uso de algunos antibióticos tales como avoparcina y virginiamicina en la alimentación animal, más tarde se impuso en Dinamarca y Noruega desde 1995 a 1998 y en la Unión Europea (Khurram *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2006).

En nuestro país, y en lo que a producción animal se refiere en diciembre de 2015 se creó el Programa Nacional de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos en animales de consumo humano puesto en práctica por SENASA (MS-MAGyP, 2015).

Frente a este panorama, numerosas líneas de investigación están dirigidas hacia la búsqueda de aditivos alternativos que permitan reemplazar a los antibióticos como promotores de crecimiento (AGP).

### **Chía (*Salvia hispanica L.*)**

Chía (*Salvia hispanica L.*) es una planta herbácea anual de la familia *Lamiaceae*, cuya utilización, consumo y producción se ha incrementado en los últimos años por su conocido aporte de ácidos grasos esenciales omega n-3 y el contenido de niveles elevados de fibra dietética, proteínas, minerales y compuestos fenólicos (Capitani, 2013).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se caracterizan por la presencia de dos o más enlaces dobles entre las cadenas de carbono que constituyen el ácido graso. A diferencia de los ácidos monoinsaturados, los AGPI son esenciales para el organismo, debido a la incapacidad que posee de sintetizarlos, por lo que deben ser ingeridos en la dieta. Los principales ácidos grasos esenciales son: el ácido linoleico (18:2) y el ácido linolénico (18:3), denominados omega n-6 y omega n-3 respectivamente. Un elevado

contenido de AGPI contribuiría a la disminución de enfermedades coronarias, a causa de la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre.

Con referencia a la semilla de chía, esta contiene alrededor del 40% de aceite, del cual cerca del 62-64% es ácido  $\alpha$ -linolénico y alrededor de 20% de ácido linoleico (Ayerza *et al.*, 2002). Posee bajo contenido de sodio, y es fuente importante de diversos minerales como por ejemplo: calcio, fósforo, magnesio, potasio, hierro y zinc (Ayerza *et al.*, 2005). Su contenido de proteínas, lípidos y fibra es mayor que el de diversos cereales como el arroz, cebada, avena, trigo y maíz (Capitani, 2013; USDA, 2002). Por otro lado, no contiene gluten, una ventaja a la hora de su agregado en una dieta para personas celiacas.

Estas características explican el beneficio sobre la salud humana y su uso como nueva fuente de alimentación, rica en ácidos grasos insaturados. Por otra parte, es promisoría su utilización para mejorar parámetros relacionados con la salud y la inocuidad de animales monogástricos.

### **Harina de chía**

El subproducto del proceso de extracción del aceite procedente de la semilla de chía, es una harina de color marrón claro, con bajo porcentaje en grasas; al igual que la semilla, posee un alto contenido de fibra de alrededor del 40%, del cual 5% es fibra soluble, denominada mucilago. Esta sustancia es un polisacárido de alto peso molecular (Lin *et al.*, 1994), que envuelve a la semilla luego de la hidratación de la misma. Los investigadores han estudiado recientemente las propiedades del mucilago, entre las que se pueden mencionar: la estabilización de emulsiones, control de la sinéresis (separación de fases) y atributos gelificantes (Philips & Williams, 2000). Otro punto para destacar, es que al ser parte constituyente de la fibra dietética soluble tiene la particularidad de crear geles de alta viscosidad, que enlentecen el vaciado gástrico y generan sensación de saciedad (Hentry *et al.*, 1990).

La harina de chía está constituida por compuestos polifenólicos, como el ácido cafeico, el clorogénico y la quercetina, que le otorgan un notable poder antioxidante, además proporciona vitaminas y minerales.

En los últimos años, el empleo de este subproducto se ha tornado una estrategia de alimentación en gallinas ponedoras y pollos parrilleros para la obtención de productos funcionales. En el caso del huevo y la carne de pollo se puede obtener un mejor perfil de ácidos grasos mediante la incorporación de determinados lípidos y minerales en las dietas de las aves (Saadoun, 2014).

Azcona *et al.*, (2008), utilizando distintas fuentes de omega n-3, demostró que la incorporación de semillas de chía y harina de chía en la dieta de los pollos parrilleros,

mejoraron las relaciones omega n-6/omega n-3 y ácidos grasos saturados/omega n-3 en pechugas y muslos de estos animales. Ayerza *et al.*, (2002), obtuvo resultados similares, al adicionar a la dieta basal de pollos, 10 y 20 % de semillas de chía, aunque el peso corporal y la conversión alimenticia fue significativamente menor que en las dietas control. Dichos autores, encontraron que el agregado de cantidades crecientes de semillas de chía a las dietas de gallinas ponedoras aumentaba el contenido de AGPI en las yemas de los huevos, y este incremento era mayor en las yemas de las gallinas blancas.

### **Hidroxitirosol**

Numerosas investigaciones han asociado la dieta mediterránea a un menor riesgo de afecciones cardiovasculares (Keys *et al.*, 1980; De Lorgerill *et al.*, 1999; Trichopoulou *et al.*, 1999) y enfermedades cancerígenas (Trichopoulou *et al.*, 2000).

Uno de los componentes principales de esta dieta, es el aceite de oliva que juega un rol fundamental en los beneficios mencionados anteriormente, debido a la presencia de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y a compuestos minoritarios como los polifenoles.

Los fenoles son sustancias presentes en las plantas, que contienen en su estructura molecular uno o más anillos fenólicos, implicados en diversos procesos fisiológicos o bien son sintetizados como producto de su metabolismo secundario. En el caso del olivo, los principales compuestos fenólicos son: tirosol, oleuropeína e hidroxitirosol (H).

El (3,4-dihidroxifenil) etanol conocido como hidroxitirosol se encuentra en las hojas y en los frutos del olivo, en forma libre y esterificada. A diferencia del tirosol, posee un grupo oxhidrilo adicional en el anillo de benceno. Por lo tanto, posee mayor actividad en la eliminación de radicales libres, aumentando así su poder antioxidante y la eficiencia en la reducción del estrés oxidativo (Chimi *et al.*, 1999).

Existe bibliografía que describe los procedimientos de obtención de H (Moreno *et al.*, 2005), los cuales pueden ser a través de la hidrólisis del extracto de la hoja de olivo o a partir de diversos subproductos de la industria aceitera olivícola.

Diversas investigaciones han demostrado numerosas propiedades biológicas adjudicadas al H. Además de su capacidad antioxidante, presenta actividad anti-esclerótica (EPSA, 2012), antiinflamatoria (Silva *et al.*, 2015), anticancerígena (Della Ragione *et al.*, 2000), antimicrobiana (Furneri *et al.*, 2004; Bisignano *et al.*, 1999) e induce la apoptosis en células HT29 (adenocarcinoma de colon) (Fabiani *et al.*, 2002) y células HL60 (leucemia promielocítica) (Della Ragione *et al.*, 2000).

Los estudios realizados sobre los efectos de este polifenol en animales *in vivo* son escasos y en su mayoría han utilizado extractos que contienen un conjunto de polifenoles, entre ellos el H. Ochoa *et al.*, (2002), trabajando en conejos observó el incremento del contenido antioxidante, vitamina E y coenzima Q de las lipoproteínas LDL. Por otra parte, en ratas, el consumo de una dieta suplementada con compuestos polifenólicos del aceite de oliva, presentó un aumento en la concentración de lipoproteínas HDL (Mangas Cruz *et al.*, 2001). En el caso de pollos de engorde, Oke *et al.*, (2017) concluyó que el agregado de extracto de hoja de olivo, mejoró el rendimiento de estos animales en condiciones de estrés durante la estación seca y calurosa. Además, en otro estudio, utilizando el extracto mencionado anteriormente, no se observaron efectos positivos en la utilización de energía y nutrientes para la conversión alimenticia de esas aves (Leskovec *et al.*, 2017).

### **Impacto de la dieta en la microflora intestinal**

Comparadas con otros animales, las aves utilizan grandes cantidades de energía (Clench *et al.*, 1995). Es por ello, que la interacción entre los procesos bioquímicos producidos por el organismo del pollo y la microflora presente en el tracto gastrointestinal permiten la extracción de energía y nutrientes necesarios, aportados por el alimento.

La microbiota intestinal cumple la función de generar defensas y proporcionar nutrientes, mediante la fermentación y otros productos secretados (Snel *et al.*, 2002). Además, actúa evitando la colonización de patógenos y estimulando la inmunidad del hospedador (Brisbin *et al.*, 2008; Ravindran *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2001).

Una estrategia importante para mejorar el rendimiento en el crecimiento y la eficiencia alimentaria, es la manipulación de la flora microbiana y sus funciones. Lograr un impacto en las comunidades bacterianas alojadas en el intestino de los pollos, es posible a través de cambios en la composición de las dietas. Las nuevas alternativas en cuanto a aditivos tienen efectos directos o indirectos sobre los microorganismos intestinales (Richards *et al.*, 2005).

Los desafíos que presenta la avicultura moderna en la actualidad consisten en: investigar la microbiota que maximiza los beneficios y minimice los costos, desarrollando así un manejo nutricional adecuado para establecerla.

### **Excretas**

La evaluación de la población bacteriana fecal es una técnica que permite evaluar los cambios en la dieta, así como también conocer el estado sanitario o la presencia de patógenos en los pollos. La microbiota fecal posee bacterias pertenecientes a distintos

segmentos del tracto gastrointestinal (Sekelja *et al.*, 2012) y constituye una vía de transmisión de bacterias patógenas o benéficas.

A su vez, las excretas forman parte de los residuos producidos por la intensificación de la producción avícola. En el caso de pollos parrilleros las mismas se encuentran junto a diferentes materiales como por ejemplo: aserrín, viruta, paja, cáscara de arroz o girasol, plumas y pequeñas cantidades de alimento balanceado, denominándose cama de pollo.

Para evitar problemas de salud y contaminación ambiental de los recursos naturales es imprescindible el manejo racional y eficiente de este subproducto avícola. El SENASA por la Resolución 542/2010 establece el tratamiento de los residuos como el compostaje u otro método, que inactive el accionar de agentes patógenos, previo a la eliminación del establecimiento avícola (Federico, 2016). En nuestro país, se recomiendan diversos sistemas de tratamientos para la cama de pollo o el guano de gallinas ponedoras, que permite su posterior utilización como enmienda orgánica.

- Compostaje: es una técnica que permite la descomposición y estabilización biológica de sustratos orgánicos, para la obtención de un producto estable, libre de malezas y patógenos. Implica dos etapas: descomposición y maduración.
- Pellet: involucra un secado previo de las excretas para su posterior pelleado. En este proceso se efectúa la compresión, moldeado utilizando altas temperaturas.
- Incineración: su utilización requiere de la aplicación de temperaturas de alrededor de 1000 a 1200 °C. Es un tratamiento en el que se obtienen cenizas aptas para la fertilización, con un alto contenido de carbono.
- Generación de biogás: se obtiene un producto que es utilizable como energía calórica o bien convertirse en energía eléctrica. Es un proceso que demanda mano de obra calificada y una elevada inversión inicial.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

- El agregado de hidroxitirosol y harina de chía (*Salvia hispánica L.*) a la dieta influye sobre la dinámica microbiana presente en las heces de los pollos parrilleros.
- El agregado de estos aditivos en la dieta de pollos parrilleros optimiza la calidad de las excretas.

### **Objetivos**

#### Objetivos generales

- Determinar los efectos de las dietas adicionadas con hidroxitirosol y harina de chía (*Salvia hispanica L.*) sobre la ecobiota microbiana de las excretas de los pollos parrilleros.

#### Objetivos específicos

- Realizar recuento de hongos y levaduras, bacterias heterótrofas, coliformes totales, fecales y *Pseudomonas spp.* en materia fecal de pollos parrilleros.
- Evaluar los parámetros químicos y la actividad biológica de la biomasa presentes en las excretas para determinar la calidad de las mismas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó adelante en los meses de octubre y noviembre del año 2016, en la Unidad Experimental Avícola (UEA) del Departamento de Agronomía, perteneciente a la Universidad Nacional del Sur, situada en la ciudad de Bahía Blanca.

Para la experiencia se utilizaron noventa y seis pollos parrilleros línea Cobb, alimentados con cuatro dietas experimentales.

### Alojamiento

El ensayo tuvo lugar en un galpón de 35 m<sup>2</sup>, con las instalaciones adecuadas para suministrar: ventilación, iluminación y la temperatura correcta de los pollos de acuerdo a la edad.

Se utilizaron 16 corrales, divididos en 4 bloques, elevados del suelo, construidos con madera y alambre hexagonal, de 1 metro por 1 metro.

### Cría y Manejo

La cría de los pollos parrilleros estuvo dividida en dos etapas.

- La primera parte, tuvo una duración de tres semanas, desde la llegada de los pollitos al galpón hasta el día 21. En esta etapa, los animales fueron divididos en dos grupos, ubicados en corrales de 2 m<sup>2</sup> cada uno. Para la alimentación de éstos, se utilizó comederos bandejas y bebederos con depósito invertido. Durante este periodo, los pollitos recibieron un iniciador *ad libitum*.

- Antes de comenzar la última etapa (a partir del día 22 hasta la faena), los pollos fueron sexados por el método del ala, el cual se realizó para obtener una mayor uniformidad del lote. Posteriormente, fueron distribuidos al azar en 16 lotes de 6 animales cada uno, dispuestos en cuatro bloques. Cada corral constaba con un comedero tipo canaleta de 1 metro de longitud, con dos bebederos chupete, conectados a un tanque de agua. Los animales fueron a alimentados *ad libitum* con cuatro tratamientos asegurando un 10% de rechazo.

Es importante destacar que, tanto el manejo como los protocolos de experimentación con los animales, cumplieron las normas de seguridad sugeridas por la Universidad Nacional del Sur, conforme lo establecido por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) para la cría de pollos parrilleros.

### Sanidad

El primer día que los pollitos llegaron al galpón se les administró un tratamiento microbiano de amplio espectro (ENRO) más un polivitamínico en los bebederos.

Posteriormente, el día 7 se les aplicó una vacuna combinada contra las enfermedades de Newcastle + bronquitis infecciosa; en el día 15 se vacunó contra Gumboro.

### Dietas experimentales

Como se mencionó anteriormente, durante el período inicial del ensayo, los pollitos recibieron un Iniciador *ad libitum*, cuya composición química e ingredientes se detallan en la Tabla 1.

En el lapso de tiempo comprendido desde día 22 hasta la faena (día 46) los animales recibieron las siguientes dietas (tratamientos):

- **Control:** dieta sin aditivos.
- **W<sub>3</sub>:** dieta con 10% de harina de chía
- **W<sub>3</sub> + H:** dieta con 10% de harina de chía + hidroxitirosol
- **H:** dieta con hidroxitirosol

Se suministró harina de chía como fuente de ácidos grasos omega n-3, donada por la empresa DESUS S.A., cuya composición se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Ingredientes y composición química de la dieta iniciadora destinada a la crianza de pollos parrilleros.

<b>Iniciador</b>			
<b>Ingredientes (%)</b>		<b>Composición química</b>	
<b>Maíz</b>	62,00	<b>EM (Kcal.kg<sup>-1</sup>)</b>	3035
<b>Harina de soja</b>	30,00	<b>PB (%)</b>	19,66
<b>Harina de carne</b>	5,75	<b>Calcio (%)</b>	1,05
<b>Conchilla</b>	0,75	<b>Fósforo total (%)</b>	0,69
<b>Lisina</b>	0,20	<b>Metionina + Cistina (%)</b>	0,82
<b>Sal</b>	0,25	<b>Lisina (%)</b>	1,26
<b>Núcleo vitamínico – mineral<sup>1</sup></b>	0,50	<b>Lípidos (%)</b>	4,10
		<b>Fibra (%)</b>	2,85

<sup>1</sup>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: 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.

**Tabla 2.** Composición química de la harina de chía.

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

En cuanto al hidroxitirosol, se administró 7 mg. kg PV<sup>-1</sup>. d<sup>-1</sup>, el cual era pesado y adicionado a la dieta diariamente. Esta dosis se ajustó semanalmente, de acuerdo al peso de los pollos.

La composición química y porcentual de los distintos tratamientos se detalla en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Ingredientes y composición química de las dietas experimentales (22-46 días).

<b>Terminador</b>	<b>C</b>	<b>W<sub>3</sub></b>	<b>W<sub>3</sub>+H</b>	<b>H</b>
<b><u>Ingredientes (%)</u></b>				
<b>Maíz</b>	69,00	69,00	69,00	69,00
<b>Harina de Soja</b>	23,50	16,65	16,65	23,50
<b>Harina de Carne</b>	6,30	6,30	6,30	6,30
<b>Harina de Chía</b>	-	10,00	10,00	-
<b>Conchilla</b>	0,30	0,30	0,30	0,30
<b>Lisina</b>	0,20	-	-	0,20
<b>Sal</b>	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>Núcleo Vitamínico Mineral<sup>1</sup></b>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>DL-metionina</b>	0,12	0,12	0,12	0,12
<b>Hidroxitirosol</b>	-	-	SÍ	SÍ
<b><u>Composición química</u></b>				
<b>EM (Kcal.kg<sup>-1</sup>)</b>	3.128	3.169	3.169	3.128
<b>PB (%)</b>	18,52	18,48	18,48	18,52
<b>Calcio (%)</b>	0,92	1,00	1,00	0,92
<b>Fósforo total (%)</b>	0,70	0,84	0,84	0,70
<b>Metionina + Cistina (%)</b>	0,74	0,74	0,74	0,74
<b>Lisina (%)</b>	1,11	1,18	1,18	1,11
<b>Lípidos (%)</b>	4,34	6,00	6,00	4,34
<b>Fibra (%)</b>	2,59	4,76	4,76	2,59

C: control; W<sub>3</sub>: dieta con 10% de harina de chía; W<sub>3</sub> + H: dieta con 10% de harina de chía e hidroxitirosol; H: dieta con hidroxitirosol (7 mg.kg PV<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup>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.

### Provisión de agua

La Unidad Experimental Avícola se provee de agua de red (ABSA S.A.) para realizar los ensayos. El control de cloro libre dio como resultado 0,22 mg/L y libre de patógenos.

### Muestreo

Las muestras de excretas se recogieron asépticamente 36 días post comienzo del ensayo. Para la recolección se utilizó bandejas de plástico que fueron colocadas debajo de los corrales. De cada bandeja se reservó 200 gramos de materia fecal.

### **Procesamiento de las muestras**

Se obtuvieron un total de 16 muestras, correspondientes a las 4 repeticiones por tratamiento.

De cada muestra homogeneizada, se pesó 10 gramos de excreta, la cual se disolvió en 90 ml de agua destilada con agitación constante de una hora a temperatura ambiente.

A partir de estas disoluciones, se tomaron las correspondientes alícuotas, para realizar los análisis microbiológicos de las excretas.

Para los análisis físico-químicos se realizó una dilución 1:10, tomando 25 gr de excreta en 250 de volumen final con agua destilada (para realizar los análisis espectrocolorimétricos).

### **Análisis microbiológicos**

- Recuento de bacterias heterótrofas en placa (RHP) en agar nutritivo (AN Britania®) mediante la técnica de diluciones decimales y siembra por diseminación en placa.
- Coliformes totales (CT) y Coliformes fecales (CF) por duplicado, utilizando la técnica de fermentación en tubos múltiples (Merck®), de acuerdo a Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas (Blodgett, 2006).
- Levaduras utilizando los medios Hongos y Levaduras (Britania®).
- *Pseudomonas* spp. en Pseudomonas Agar F (Merck®) con la técnica de diluciones decimales por diseminación en placa.

### **Recuento de bacterias heterótrofas en placa (RHP)**

El RHP es una herramienta útil que nos permite determinar la cantidad de microorganismos viables heterótrofos presentes en una muestra.

Para cuantificar estas bacterias, con la disolución inicial, se procedió a realizar las respectivas diluciones seriadas en condiciones de esterilidad. Seguidamente para la siembra en el medio de cultivo, se depositó 0,1 ml de cada dilución, aplicando la técnica de diseminación en placa. Luego se llevaron a estufa a 37 °C durante 48 horas. A continuación se efectuó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) expresando los resultados en log UFC.g<sup>-1</sup>.

### **Coliformes totales (CT) y Coliformes fecales (CF)**

Los coliformes son microorganismos que se encuentran en gran cantidad en el tracto intestinal de los animales de sangre caliente. Son bacterias Gram negativas, que tienen la capacidad de fermentar lactosa, produciendo ácido y gas cuando se incuban a una temperatura de 35-37°C.

Para la determinación de estos microorganismos se utilizó la técnica de fermentación en tubos múltiples, para ello, se sembraron 3 tubos con 1 ml, 3 de 0,1 ml y 3 de 0,01 ml con la muestra correspondiente a los respectivos tratamientos. Con la alícuota de 1 ml, se empleó caldo Mac Conkey de doble concentración con campana Durham, mientras que con las demás, caldo de simple concentración. Los tubos sembrados se llevaron a estufa por 24 a 48 horas a 37 °C. Se estimó como positivos aquellos que presentaron gas y cuando el indicador de bromocresol viró a amarillo por degradación de la lactosa. Con los tubos positivos se determinó, utilizando Tablas, el número más probable (NMP) de coliformes totales en 100 gramos de muestra (Etapa I). Los tubos que presentaron reacción positiva fueron subcultivados en caldo Mac Conkey por 48 horas e incubados en baño termoregulado a 44,5 °C. Posteriormente y mediante la Tabla, con los tubos que resultaron positivos, se obtuvo el NMP de coliformes fecales en 100 gramos de muestra (Etapa II).

### **Pseudomonas**

Para cuantificar estas bacterias se utilizó la técnica de diluciones decimales, con la posterior siembra en placas con el medio Pseudomonas Agar F, también conocido como King. Este medio presenta fosfato dipotásico que estimula la producción de fluoresceína, inhibiendo la producción de piocianina y piorrubina, además contiene glicerol, que favorece la presencia de pigmentos.

### **Levaduras**

El medio Hongos y Levaduras HyL (Britania®) permite el aislamiento de estos microorganismos debido a la presencia de cloranfenicol, que inhibe el crecimiento de bacterias. Para realizar la determinación, se realizaron diluciones decimales, y la siembra se efectuó en placas con medio HyL, en las que se diseminaron 0,1 ml de la dilución  $10^{-5}$ . Se procedió de igual forma para todos los tratamientos. Posteriormente, las placas se llevaron a estufa a 25 °C durante 4-5 días.

### **Análisis físicos químicos**

- Conductividad eléctrica (CE): suspensión 1:5 mediante conductímetro.
- pH: suspensión en agua 1:5
- Nitrógeno amoniacal
- % Humedad
- Sólidos totales
- Respiración
- P total

- **Ca y Mg**

Los protocolos de laboratorio empleados fueron los siguientes:

**Conductividad eléctrica:** TMECC Method 04.10. 2002.

**pH:** TMECC Method 04.11.2002.

**Nitrógeno amoniacal:** TMECC Method 04.02. 2002.

**% Humedad:** TMECC Method 03.09-A. 2001.

**Sólidos Totales:** TMECC Method 03.09-A. 2001.

**Respiración**

A partir de una muestra homogeneizada se tomó una alícuota de 1 g de excreta. Se utilizó el método de incubación en medio cerrado con 5 ml de NaOH (1N) descrito por Anderson (1982). El desprendimiento de CO<sub>2</sub> se estimó mediante titulación con HCl (0,1N), en presencia de tres gotas de fenolftaleína al 1%. Luego de la precipitación de los carbonatos se colocó 3 mL de BaCl<sub>2</sub> al 2%. La incubación se realizó durante 30 días a temperatura ambiente.

**Fósforo total**

Para la determinación del fósforo total se utilizó la digestión con persulfato y posteriormente se realizó la cuantificación por colorimetría.

**Ca y Mg**

Para la cuantificación de estos elementos se realizó digestión ácida con posterior lectura por absorción atómica.

**Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados como un diseño en bloques completos al azar, utilizando el programa INFOSTAT versión 2015. La comparación entre valores medios se realizó mediante el test de Tukey (Steel & Torrie, 1980).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo del intestino y la competitividad entre bacterias benéficas y perjudiciales puede modificarse mediante la manipulación de la dieta (enzimas, prebióticos, probióticos, manano-oligosacáridos y consorcios microbianos) que no solo pueden alterar la dinámica intestinal sino también procesos fisiológicos debido a los productos finales metabolizados por la microbiota (Adil *et al.*, 2012)

En la Tabla 4 se presentan los datos de los parámetros microbiológicos examinados en las excretas de los pollos parrilleros, alimentados con diferentes tratamientos.

**Tabla 4.** Parámetros microbiológicos en pollos parrilleros alimentados con distintos tratamientos.

Variables	Tratamientos					Sig.
	C	W <sub>3</sub>	W <sub>3</sub> + H	H	EE	
RHP (log UFC/g)	7,72	8,45	8,58	7,71	0,29	ns
Coliformes totales (log NMP/g)	5,17 a	7,66 b	7,98 b	4,90 a	0,34	0,0002
Coliformes fecales (log NMP/g)	4,68 b	6,50 c	6,35 c	4,39 a	0,05	0,0001
Pseudomonas (log UFC/g)	7,89 a	8,43 ab	8,84 b	7,78 a	0,25	0,05
Levaduras (log UFC/g)	5,28	5,74	5,00	5,08	0,19	ns

C: control; W<sub>3</sub>: dieta con harina de chíá; W<sub>3</sub> + H: dieta con harina de chíá e hidroxitirosol y H: dieta con hidroxitirosol. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). EE: Error estándar. Sig.: Significancia.

### Recuento de heterótrofas en placa (RHP)

Como se indica en la Tabla 4 los valores de RHP no presentaron diferencias significativas para los distintos tratamientos, presentando valores comprendidos entre 7,71 y 8,58 log UFC/g de excreta.

En las dietas adicionadas con W<sub>3</sub>+H, se observó una tendencia positiva en el recuento de organismos aerobios (8, 58 log UFC. g<sup>-1</sup>), además, estos valores superaron los obtenidos en el tratamiento W<sub>3</sub> (8,45)(Figura 1).

Por otra parte el recuento de bacterias heterótrofas, en C e H, resultó semejante e inferior en relación a los otros dos tratamientos respectivamente.



**Figura 1.** Recuento de heterótrofos en placa (RHP) expresado como log UFC/g de excretas para cada dieta experimental. C: control; W3: dieta con harina de chíá; W3 + H: dieta con harina de chíá e hidroxitirosol y H: dieta con hidroxitirosol.

### **Comportamiento de Coliformes totales (CT), fecales (CF) y *Pseudomonas* spp en los tratamientos con Harina de chíá, de forma individual y combinada**

En la Tabla 4 se compararon los resultados obtenidos en el recuento de CT, CF y *Pseudomonas* spp. presentes en las excretas de los pollos parrilleros.

Las dietas W3 y W3+H, incrementaron la carga de CT, CF y *Pseudomonas* spp., difiriendo significativamente de los otros tratamientos. A su vez, se observó que la combinación de aditivos, produjo un leve aumento en el recuento de CT y *Pseudomonas* spp. al compararlos con W3.

El aumento significativo de CT, CF y *Pseudomonas* spp. en el tratamiento W3 y W3+H, podría estar vinculado al descenso en el número de microorganismos Gram (+) asociado a la mayor competitividad de las Gram (-) frente al aporte de AGPI contenidos en la harina de chíá. Por este motivo, el agregado de aditivos que contienen AGPI favorecería la proliferación de bacterias coliformes y pseudomonas. Aportes realizados Outtara *et al.*, (1997) observaron que bacterias Gram (-) como *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia liquefaciens* no fueron inhibidas por diversos ácidos grasos entre ellos el ácido linoleico y el ácido linolénico. Resultados similares se obtuvieron en otros estudios (Dilika *et al.*, 2000; McKellar *et al.*, 1992; Kabara, 1979) en los que se demostró que las bacterias Gram (-) eran resistentes a los efectos inhibitorios de los ácidos grasos de cadena media, larga y sus derivados. Esta resistencia, fue atribuida a la presencia de los lipopolisacáridos presentes en la pared celular, que pueden inhibir la entrada de ácidos grasos, evitando que los lípidos se acumulen en los transportadores de la membrana y penetren en la célula.

Estudios *in vitro* demostraron que el agregado de ácidos grasos de diferente longitud ejercerían un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias Gram (+). Este efecto era mayor que el producido por los ácidos grasos de cadena corta, debido a que

intervenían en la desestabilización de la membrana bacteriana, el desacople de la síntesis de ATP y la formación de ácidos grasos hidroperóxidos (Jae-Suk *et al.*, 2013; Sheu & Freese, 1972).

El ácido linolénico es el precursor de seis tipos de ácidos omega n-3, dentro de los cuales se encuentra el EPA (ácido eicosapentaenoico). Shin *et al.*, (2006) evaluaron la actividad antimicrobiana de este compuesto en bacterias Gram (+) y (-). EPA redujo significativamente el crecimiento de cuatro cepas bacterianas Gram (+) y solo una Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando un microscopio electrónico de barrido en las células bacterianas inhibidas, encontraron daños severos producidos en la membrana externa de estas células. En el caso de *P aeruginosa* presentaban pequeñas hendiduras distribuidas de forma regular en la superficie celular. Esta diferencia en la sensibilidad hacia los ácidos grasos puede atribuirse a la impermeabilidad de la membrana de las bacterias Gram (-), que actuaría como una barrera efectiva contra muchas sustancias hidrófobas incluida la cadena larga de ácidos grasos

Wang & Johnson, (1992) encontraron que la inhibición de los ácidos grasos insaturados de cadena larga en bacterias Gram (+) no solo se debía al equilibrio hidrofóbico/ hidrofílico sino que estaba relacionado a un proceso peroxidativo, en el cual estaban involucrados el peróxido de hidrógeno.

Zheng *et al.*, (2005) estudiaron el mecanismo por el cual los ácidos grasos insaturados de cadena larga presentaban actividad antimicrobiana. Estos autores descubrieron que ácidos como el linoleico, palmitoleico, oleico y linolénico inhibían la acción de la proteína transportadora de acilos, fundamental en la síntesis de ácidos grasos. Además, observaron que la suplementación de ácidos grasos, revertía esta inhibición. Esto coincide con un estudio realizado por Watanabe *et al.*, (1994), en el que demostraron que las bacterias son capaces de incorporar AGPI presentes en el medio de cultivo.

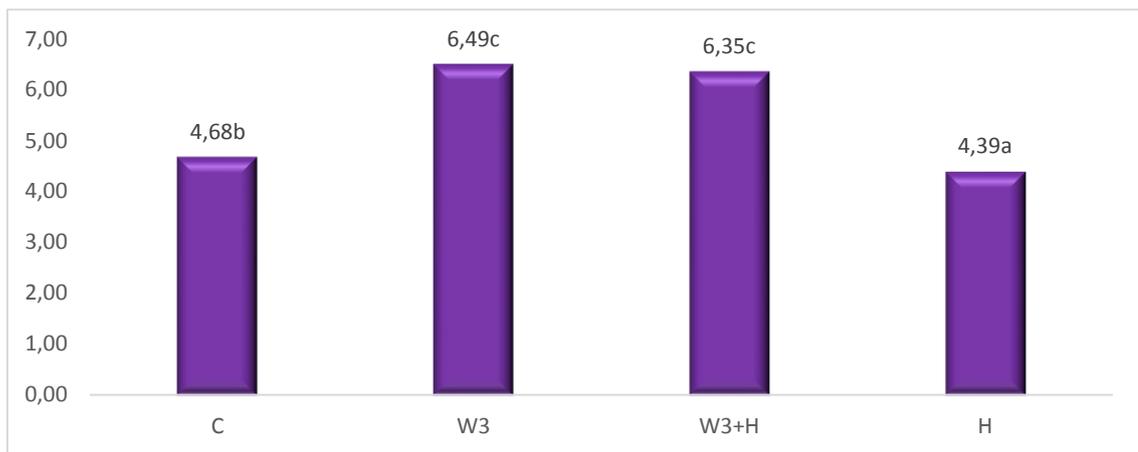
Aportes realizados por Kankaanpää *et al.*, (2001), en condiciones de laboratorio, investigaron el efecto de distintos tipos de ácidos poliinsaturados en el crecimiento y adhesión de cepas de *Lactobacillus*. Dichos autores determinaron que altas concentraciones de AGPI inhibieron el crecimiento, sin afectar la viabilidad de las bacterias. A su vez, observaron que la adhesión a la mucosa intestinal, fue afectada negativamente por estos ácidos.

La fibra dietética de la harina de chía posee paredes celulares, polisacáridos no amiláceos y lignina (Bach Knudsen, 2001). Una característica de la fibra dietética es su capacidad de aumentar la retención de agua, por lo que incrementa la viscosidad en el ambiente intestinal, retrasando el vaciado gástrico, afectando la digestión y absorción en el intestino delgado (Celi *et al.*, 2017). El aumento de la viscosidad, facilita el

sobrecrecimiento de bacterias en los segmentos superiores del intestino delgado (Ravindran, 2010).

En diversos estudios llevados a cabo con cerdos destetados, se registró la proliferación de *Escherichia coli* como consecuencia del aumento de la viscosidad del contenido intestinal (Hopwood *et al.*, 2002; Mc Donald *et al.*, 2001).

### Coliformes fecales (CF) en el tratamiento con Hidroxitirosol



**Figura 2.** Recuento de coliformes fecales (CF) expresado como log NMP/g de excretas para cada dieta experimental. C: control; W3: dieta con harina de chía; W3 + H: dieta con harina de chía e hidroxitirosol y H: dieta con hidroxitirosol.

En la Figura 2, el recuento de coliformes fecales (CF) en el tratamiento H disminuyó significativamente ( $p < 0,0001$ ) con respecto a W3, W3+H y C, lo que indicaría una posible inhibición de bacterias Gram (-). Schimdt (2018) obtuvo resultados similares, demostrando la capacidad inhibitoria en condiciones *in vitro* del hidroxitirosol sobre *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Medina Pradas, (2008) obtuvo conclusiones análogas sobre *L. monocytogenes* al aislar compuestos fenólicos, entre ellos el H, presentes en aceite de oliva.

Las hojas de olivo contienen determinadas sustancias fisiológicas como el hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vainillina, oleuropeína, luteolina, diosmetina, rutina, verbascósido, luteolina-7-glucósido y apigenina-7-glucósido (Tasioula-Margari & Okogeri, 2001).

En trabajos realizados por Pereira *et al.*, (2007), se analizó la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de olivo frente a distintos géneros bacterianos como: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *E coli*, *P aeruginosa*, etc y a dos especies de hongos. Aportes por Sarica & Urkmez, (2016), suplementando las dietas con el mismo extracto en pollos parrilleros, registraron la reducción en las

concentraciones de coliformes totales y *E. coli*. La actividad antioxidante del hidroxitirosol es estable en el jugo gástrico de los pollos, por lo que modula la actividad microbiana en el ambiente intestinal. Cabe señalar que la mayoría de los polifenoles son transformados por el colon por la microflora residente en ese segmento intestinal (Gikas *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 1995).

### Levaduras

Los tratamientos con harina de chía e hidroxitirosol no presentaron diferencias significativas con respecto a C ( $p < 0,09$ ). En la Figura 5 se puede observar los efectos positivos de la dieta W3 ( $5,74 \log \text{UFC.g}^{-1}$ ) con respecto a la presencia de levaduras nativas. Mientras que los tratamientos W3+H e H, registraron una disminución de estos microorganismos, inferiores a C ( $5,28 \log \text{UFC.g}^{-1}$ ).



**Figura 3.** Levaduras expresadas como log UFC/g de excretas para cada dieta experimental. C: control; W<sub>3</sub>: dieta con harina de chía; W<sub>3</sub> + H: dieta con harina de chía e hidroxitirosol y H: dieta con hidroxitirosol.

La población de levaduras nativas proveniente del alimento balanceado, se mantuvo a lo largo del período de crecimiento del animal, sin presentar marcadas variaciones estos resultados, contribuirían a la homeostasis de la ecobiota intestinal, debido a la capacidad competitiva natural que poseen estos microorganismos eucariotas debido a la presencia de mananos y glucomananos en su pared celular (Bichara, 2019; Lanaro, 2019)

Mediante la observación en microscopio óptico (x400) y clave taxonómica se determinó la presencia de dos tipos de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (SC) y *Rhodotorula sp.* Guida *et al.*, (2015) verificaron en condiciones *in vitro* la acción aglutinante de SC sobre diferentes géneros bacterianos y *E.coli* aislada de materia fecal de pollos parrilleros. Este proceso de aglutinación, producido por los mananos y glucomananos, presentes en la pared de SC, evita la adhesión de los patógenos o

microorganismos indeseables a las células epiteliales del intestino animal. Este mecanismo de aglutinación permite la exclusión de los mismos por vía fecal.

En 1975, Walenga & Lands, analizaron el efecto del agregado de AGPI en el crecimiento de SC. Los autores evidenciaron una eficiencia mayor en el crecimiento de esa levadura. Así mismo, se verificaron modificaciones en la composición lipídica de la membrana plasmática de SC en presencia de ácidos grasos y ergosterol (Redon Miralles, 2011)

### Análisis físico-químicos

Es conveniente señalar que los análisis se realizaron sobre excretas frescas de pollo debido a que los animales estaban alojados en corrales con piso cribado, a 20 cm del suelo.

En la tabla 5 se presentan los resultados de los análisis físico químicos realizados en las excretas de los pollos parrilleros en los distintos tratamientos.

**Tabla 5.** Parámetros físico-químicos en pollos parrilleros alimentados con distintos tratamientos.

Variables	Tratamientos			
	C	W <sub>3</sub>	W <sub>3</sub> +H	H
pH	8,30	8,05	8,00	7,83
Cond. (mS. cm <sup>-1</sup> )	4,87	4,63	3,94	4,35
Respiración (mg CO <sub>2</sub> . g <sup>-1</sup> )	23,1	47,85	34,65	26,40
NH <sub>4</sub> (mg. kg <sup>-1</sup> )	267,50	271,00	112,70	185,70
P (mg. kg <sup>-1</sup> )	347,00	391,50	411,00	289,00
Ca (log mg.kg <sup>-1</sup> )	4,20	4,29	4,02	3,94
Mg (log mg.kg <sup>-1</sup> )	3,59	3,78	4,05	3,92
Sólidos totales (%)	61,52	70,04	64,64	60,88
Humedad (%)	22,76	33,73	20,81	22,80

C: control; W<sub>3</sub>: dieta con harina de chía; W<sub>3</sub> + H: dieta con harina de chía e hidroxitirosol y H: dieta con hidroxitirosol. Cond.: conductividad eléctrica; NH<sub>4</sub>: amonio; P: fosforo; Ca: calcio; Mg: magnesio.

Como se puede observar en la Tabla 5 los valores de pH para las distintas dietas, resultaron ser levemente alcalinos, siendo el más bajo para H (7,83) y el más elevado para el tratamiento C (8,30). Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los rangos de pH determinados para la cama de pollo entre 7 y 8,5 (Paterlini *et al.*, 2017). El pH es un parámetro que influye y condiciona el desarrollo de los microorganismos. Valores bajos de pH dificultan la descomposición de la materia orgánica por parte de la biomasa microbiana.

La conductividad eléctrica (CE) es una variable que indica el contenido de sales solubles presente en las heces de los pollos. En los análisis, la CE produjo valores entre  $3,94 \text{ mS.cm}^{-1}$  para W3+H y  $4,87 \text{ mS.cm}^{-1}$  para C. A diferencia del pH, las excretas frescas tomaron valores inferiores a los obtenidos para la cama de pollos, los cuales varían entre 7,6 a 11,6 (Turnell *et al.*, 2006). Contrariamente a lo observado por Paterlini *et al.*, (2017) en cama de pollo fresca, los valores en los tratamientos presentaron pH ligeramente alcalino y una baja CE.

En un experimento realizado con gallinas ponedoras (MINAGRI, 2019) el pH fue de 6,67 mientras que la CE presentó valores de  $15,59 \text{ mS.cm}^{-1}$ .

La mineralización consiste en la transformación de un compuesto orgánico en uno inorgánico como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), aunque relacionado a este proceso pueden liberarse otros nutrientes. La señal más evidente de la mineralización es la respiración, en la que los microorganismos aerobios producen  $\text{CO}_2$  y consumen oxígeno (Frioni, 2011).

El tratamiento W3 produjo una producción de  $47,85 \text{ mg CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ , siendo superior al resto de los tratamientos. El incremento en la respiración podría atribuirse al contenido de carbono orgánico presente en las excretas, que serviría como sustrato para los microorganismos aerobios heterotróficos (Acosta *et al.*, 2006). A su vez, en los análisis microbiológicos realizados en este ensayo, W3 presentó una tendencia positiva en el RHP, lo que indicaría que estas variables podrían estar vinculadas.

En la Tabla 5, se exhiben los resultados de la cuantificación de:  $\text{NH}_4$ , P, Ca y Mg, cuatro macronutrientes importantes presentes en este subproducto avícola. En el caso del  $\text{NH}_4$ , los tratamientos W3+H y H presentaron valores de 112,70 y 185,70  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente, similares a los obtenidos por Stamatti & De Carli (2013) en gallinaza (ponedoras), pero a la vez superiores a los de cama de pollo. El elevado contenido de compuestos nitrogenados se relacionaría a la presencia de N orgánico proveniente de microorganismos muertos y viables procedentes del tubo digestivo como también de proteínas no digeribles presentes en la dieta.

Con respecto al P, el resultado obtenido en W3 fue 18% superior al C, mientras que H ( $289,00 \text{ mg.g}^{-1}$ ) registró el valor más bajo en relación al resto de los tratamientos. Datos publicados por American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE, 2010) calculados en base a fórmulas, presentaron resultados similares a los obtenidos en estos tratamientos en excretas frescas.

El contenido de Ca fue mayor en C ( $4,20 \text{ log mg.kg}^{-1}$ ) y W3 ( $4,29 \text{ log mg.kg}^{-1}$ ), lo que podría atribuirse a la escasa absorción de este elemento en el lumen intestinal (Prosky & De Vries, 1992) y al contenido elevado de fibra presente en las dietas que incrementan la excreción fecal del Ca, como también del Mg. Estos elementos

presentaron valores similares entre ellos, a diferencia de los obtenidos por Adeli *et al.*, (2010) en cama de pollo, donde el Mg reporta valores 80 % inferiores a los presentes en Ca.

En relación a la humedad, el mayor porcentaje lo presentó el tratamiento W3 (33,73%). Stamatti & De Carli (2013) establecen un rango de 25 a 50 % para cama de pollo. Según los datos obtenidos en esta experiencia, los porcentajes de humedad presentaron valores inferiores a 33,7 %, lo que podría atribuirse a la ausencia de residuos tales como viruta, paja, cáscara de girasol, etc. que son normalmente utilizados para la cama durante la crianza de pollos parrilleros.

Viola *et al.* (2018) utilizando polifenoles vegetales en la dieta de gallinas ponedoras, como estrategia para mejorar la bioseguridad del plantel, observaron una disminución del porcentaje de humedad en las excretas, reduciendo así la proliferación de insectos y mejorando las condiciones de transporte y el bienestar animal.

## CONCLUSIONES

El aporte de ácidos grasos de cadena larga así como la viscosidad producida por el mucilago de la harina de chía favorece la proliferación de coliformes fecales y *Pseudomonas* spp. Una opción posible sería la utilización de harina de chía desmucilaginata en las dietas de pollos parrilleros.

El tratamiento con hidroxitirosol presentó propiedades antimicrobianas sobre coliformes fecales. El suministro de polifenoles no flavonoides en la dieta por su condición de antioxidante mejora las condiciones de equilibrio en la microbiota entérica.

La harina de chía y el hidroxitirosol, administrados individualmente en la dieta basal, benefician el desarrollo de levaduras nativas como *Saccharomyces* spp. ya que poseen capacidad aglutinante, eliminando las bacterias potencialmente patógenas.

Las dietas suplementadas con W3 e hidroxitirosol favorecieron la calidad de las excretas crudas, reduciendo el pH y CE. La disminución de estas variables reduce la volatilización de  $\text{NH}_3$  como también el riesgo de salinización del suelo.

Las condiciones de crianza lograron un bajo contenido de humedad en las excretas lo que produjo escasos olores desagradables por la disminución de la volatilización del amoníaco, optimizando las condiciones del hábitat para las aves y los criadores.

Conocer la composición físico química permite garantizar un manejo sostenible y eficiente de las excretas crudas. El compostaje de los subproductos obtenidos de la producción avícola es obligatorio, para lograr un agroecosistema sustentable.

## BIBLIOGRAFÍA

Acosta, Y., Cayama, J., Gómez, E., Reyes, N., Rojas, D., & García, H. (2006). Respiración microbiana y prueba de fitotoxicidad en el proceso de compostaje de una mezcla de residuos orgánicos. *Multiciencias*, 6(3), 220-227.

Adeli, A., Tewolde, H., Sistani, K., & Rowe, D. (2010). Comparison of broiler litter and commercial fertilizer at equivalent N rates on soil properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41(20), 2432-2447.

American Society of Agricultural and Biological Engineers (A.S.A.B.E.). (2010). A.S.A.B.E. Standards. USA.

Ayerza, R., & Coates, W. (2005). *Chia, rediscovering a forgotten crop of the aztecs*. The University of Arizona Press. USA.

Ayerza, R., Coates, W., & Lauria, M. (2002). Chia seed (*Salvia hispanica L.*) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poultry Science*, 81(6), 826-837.

Azcona, J. O., Schang, M. J., Garcia, P. T., Gallinger, C., Ayerza Jr, R., & Coates, W. (2008). Omega-3 enriched broiler meat: The influence of dietary  $\alpha$ -linolenic- $\omega$ -3 fatty acid sources on growth, performance and meat fatty acid composition. *Canadian Journal of Animal Science*, 88(2), 257-269.

Bichara, A. (2019). Estudio del potencial probiótico de *Saccharomyces* spp. aisladas de intestino de pollos parrilleros. Trabajo de Intensificación para optar el título de Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional del Sur. Argentina. (pp. 35).

Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. L., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971-974.

Brisbin, J. T., Gong, J., & Sharif, S. (2008). Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Animal Health Research Reviews*, 9(1), 101-110

Capitani M. I. (2013). Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica L.*) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP). Argentina.

Celi, P., Cowieson, A. J., Fru-Nji, F., Steinert, R. E., Kluentner, A. M., & Verlhac, V. (2017). Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 88-100.

Chimi H., Cillard J., Cillard P., & Rahmani M. (1991) Peroxyl and hidroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *JAOCS* 68, 307-312.

Clench, M. H., & Mathias, J. R. (1995). The avian cecum: a review. *The Wilson Bulletin*, 93-121.

De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 99(6), 779-785.

Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., Della Pietra, V., Pontoni, G., Racioppi, L., & Zappia, V. (2000). Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(3), 733-739.

Demir, E., Sarica, Ş., Özcan, M. A., & Sui Mez, M. (2003). The use of natural feed additives as alternatives for an antibiotic growth promoter in broiler diets. *British Poultry Science*, 44(S1), 44-45.

Dilika, F., Bremner, P. D., & Meyer, J. J. M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, 71(4), 450-452.

EFSA Panel on Dietetic Products; Nutrition and Allergies (NDA). (2012). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639, further

assessment) pursuant to Article 13 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* **2012**, 10, 2848.

Engberg, R. M., Hedemann, M. S., Leser, T. D., & Jensen, B. B. (2000). Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science*, 79(9), 1311-1319.

Fabiani, R.; De Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servili, M.; Montedoro, G.F.; Morozzi, G. (2002) Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.*, 11, 351–358.

Federico, V. F. J. (2016). Manual de normas básicas de Bioseguridad de una granja Avícola (pp. 44). INTA. Argentina.

Frioni, L. (2011) *Microbiología Básica, Ambiental y Agrícola*. Orientación Gráfica Editora SRL, Buenos Aires, Argentina.

Furneri, P. M., Piperno, A., Sajia, A., & Bisignano, G. (2004). Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4892-4894.

Gikas, E., Papadopoulos, N., & Tsaibopoulos, A. (2006). Kinetic study of the acidic hydrolysis of oleuropein, the major bioactive metabolite of olive oil. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(4), 497-508.

Guida, N., Mesplet, M., Kotsias, F., Gonzalez, S., Bustos, C., Laiño, M., & Mascolo, M. (2015). Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *E coli* en la cría de pollos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(8), 1-7.

Gustafson, R. H., & Bowen, R. E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 83(5), 531-541.

Hentry, H. S., Mittleman, M., & McCrohan, P. R. (1990). Introduction of Chia and tragacanth in the United States. *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, Ohio. USA.

Hopwood, D. E., Pethick, D. W., & Hampson, D. J. (2002). Increasing the viscosity of the intestinal contents stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Brachyspira pilosicoli* in weaner pigs. *British Journal of Nutrition*, 88(5), 523-532.

Jae-Suk, C., Nam-Hee, P., Seon-Yeong, H., Jae Hak, S., Inseok, K., Kwang, K., In, S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Journal of Environmental Biology* 34 (4): 673-6.

Kabara, J.J., (1979). Fatty acids and derivatives as antimicrobial 1202–1205. Agent a Review. AOCS Monograph. 5, 1–14.

Kankaanpää, P. E., Salminen, S. J., Isolauri, E., & Lee, Y. K. (2001). The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 149-153.

Kelly, D. and King, T. P. (2001). Luminal bacteria: regulation of gut function and immunity. In. *Gut environment of pigs* (pp. 113–131).A. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Keys, A. (1980). *Seven countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Harvard University Press. USA.

Knudsen, K. B. (2001). The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 90(1-2), 3-20.

Lanaro, J. (2019). Estudios ecológicos de poblaciones nativas de levaduras del género *Saccharomyces* aisladas del intestino de pollos parrilleros Trabajo de Intensificación para optar el título de Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional del Sur. Argentina. (pp. 40).

Leskovec, J., Levart, A., Žgur, S., Jordan, D., Pirman, T., Salobir, J., & Rezar, V. (2017). Effects of olive leaf and marigold extracts on the utilization of nutrients and on bone mineralization using two different oil sources in broilers. *The Journal of Poultry Science*, 0170059.

Lin, K. Y., Daniel, J. R., & Whistler, R. L. (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, 23(1), 13-18.

Mangas-Cruz, M. A., Fernandez-Moyano, A., Albi, T., Guinda, A., Relimpio, F., Lanzon, A., & Garcia-Luna, P. P. (2001). Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clinical Nutrition*, 20(3), 211-215.

McDonald, D. E., Pethick, D. W., Mullan, B. P., & Hampson, D. J. (2001). Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *British Journal of Nutrition*, 86(4), 487-498.

Medina Pradas, E. (2008). Antimicrobianos polifenólicos y oleosídicos en alimentos derivados de la aceituna. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla. España.

Miller, G. Y., P. E. Mcnamara, and R. S. Singer. 2006. Stakeholder position paper: economist's perspectives on antibiotic use in animals. *Prev. Vet. Med.* 73: 163– 168.

MINAGRI (2015). Buenas Prácticas de Manejo y Utilización de Cama de Pollo y Guano. Argentina.

MINAGRI. (2019). Guano de gallina. Valor Agronómico. Caracterización físico química del guano de gallinas ponedoras de granjas del noreste de la provincia de Buenos Aires. Argentina.

Ministerio de Salud y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2015). Estrategia argentina para el control de la resistencia antimicrobiana. Resolución Conjunta (MS-MAGyP) 834/15 y 391/15. Del 22/6/2015. B.O.: 29/6/2015.

Moreno, M., Chamorro, M. C., Poza, M. A., & de la Fuente, P. (2005). Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea L.*). *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, (368), 134-139.

Muaz, K., Riaz, M., Akhtar, S., Park, S., & Ismail, A. (2018). Antibiotic residues in chicken meat: global prevalence, threats, and decontamination strategies: a review. *Journal of Food Protection*, 81(4), 619-627.

Ochoa, J. J., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, M. C., Mataix, J., & Huertas, J. R. (2002). Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents

have different effects in fatty acid composition and peroxidation in rabbit LDL. *Nutrition*, 18(1), 60-65.

Oke, O. E., Emeshili, U. K., Iyasere, O. S., Abioja, M. O., Daramola, J. O., Ladokun, A. O., & Balogun, S. I. (2017). Physiological responses and performance of broiler chickens offered olive leaf extract under a hot humid tropical climate. *Journal of Applied Poultry Research*, 26(3), 376-382.

Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., & Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2-3), 155-162.

Paterlini, H., Gonzalez, V. & Picone, I. (2017). Calidad de la cama de pollo fresca y compostada. *Ciencia del Suelo*, 35(1).

Pereira, A., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P., Seabra, R., & Pereira, J. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.

Prosky, L., & DeVries, J. W. (1992). *Controlling dietary fiber in food products*. Van Nostrand Reinhold Ed.

Ravindran, V. (2010). Aditivos en alimentación animal: presente y futuro. *Institute of Food, Nutrition and Human Health, Massey University, New Zealand. XXVI Curso de Especialización FEDNA (Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal.)*. Madrid. España.

Redón Miralles, M. A. (2011). Estudio global del metabolismo lipídico de *Saccharomyces spp.* en fermentaciones a bajas temperaturas. Universitat Rovira i Virgili. Italia.

Richards, J. D., Gong, J., & De Lange, C. F. M. (2005). The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Canadian Journal of Animal Science*, 85(4), 421-435.

Russell, A. D. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: Food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(3), 191-201.

Saadoun, A. (2014). Nuevos enfoques de la importancia de los ácidos grasos de la carne aviar en la salud humana. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 59-61.

Sarica, S., & Urkmez, D. (2016). The use of grape seed-, olive leaf- and pomegranate peel-extracts as alternative natural antimicrobial feed additives in broiler diets. *European Poultry Science*, 80, 1-13.

Schmidt, S. (2018). 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. Trabajo de Intensificación para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional del Sur. Argentina. (pp. 40).

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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(8), 2941-2948.

Shin, S., Bajpai, V., Kim, H., & Kang, S. (2007). Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), 1515-1519.

Silva, S., Sepodes, B., Rocha, J., Direito, R., Fernandes, A., Brites, D., Freitas, M., Fernandes, E., Bronze, M., & Figueira, M. (2015) Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *J. Nutr. Biochem.* 26, 360–368.

Skraban, J., Dzeroski, S., Zenko, B., Mongus, D., Gangl, S., & Rupnik, M. (2013). Gut microbiota patterns associated with colonization of different *Clostridium difficile* ribotypes. *PLOS ONE*, 8(2), e58005.

Snel, J., Harmsen, H., Van der Wielen, P., & Williams, B. (2002). Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. In: *Nutrition and health on the gastrointestinal tract*. (pp. 37-69). Wageningen Academic Publishers.

Stamatti, G. & De Carli, R. (2013). Modalidad de uso del estiércol de la producción avícola, en la zona de Crespo Entre Ríos. INTA. Argentina.

Stanley, D., Hughes, R. J., & Moore, R. J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4301-4310.

Steel, R. G., & Torrie, J. H. (1980). *Principles and procedures of statistics, a biometrical approach* (No. Ed. 2). McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.

Tasioula-Margari, M., & Okogeri, O. (2001). Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS. *Journal of Food Science*, 66(4), 530-534.

TMECC Method (Test methods for the examination of composting and compost) (2002) 04.11.2002. Electrometric pH determinations for compost. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, N.Y., USA.

TMECC Method (Test methods for the examination of composting and compost) (2002) 04.10. 2002. Electrical conductivity for compost. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, N.Y. USA.

TMECC Method (Test methods for the examination of composting and compost) (2002) 03.09-A. 2001. Total solids and moisture at 70±5 °C. In: The United States Composting Council. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, N.Y. USA.

TMECC Method (Test methods for the examination of composting and compost) (2002) 04.02. 2002. Nitrogen. In: The United States Composting Council. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, N.Y. USA.

Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., & Lagiou, A. (1999). Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidants critical? *Nutrition Reviews*, 57(8), 253.

Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., & Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 9, 869–873.

Turnell, J. R., Hinch, G., & Faulkner, R. D. (2006). Preliminary assessment of the variability in broiler litter composition and its implication for vermiculture. In *Proceedings of the 18th Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, 20-22 February 2006* (pp. 230-233). Poultry Research Foundation.

United States Department of Agriculture. USDA (2002). Nutrient Database for Standard Reference. Release 15, Nutrient. Data Laboratory, Beltsville Research Center, US Department of Agriculture, Pennsylvania, USA.

United States Department of Agriculture. USDA (2019). Argentina Poultry and Products Annual. Foreign Agriculture Service. Global Agriculture Information Network Report. USA.

Viola, M. N., Alvarez, C. H., Craveri, A. M., Perrotta, C. H., Savoy, J. P., Savoy, J. C., & Antruejo, A. E. (2018). Polifenoles vegetales en la dieta de gallinas ponedoras usados como medida de bioseguridad para el control de moscas en los galpones. *Publicación de la Maestría en Bioseguridad Carrera de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 4(4)*, 91.

Walenga, RW & Lands, WE (1975). Eficacia de varios ácidos grasos insaturados para apoyar el crecimiento y la respiración en *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista de Química Biológica, 250 (23)*, 9121-9129.

Wang, L. L., & Johnson, E. A. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(2), 624-629.

Williams, P. A., & Phillips, G. O. (2009). Introduction to food hydrocolloids. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 1-22). Woodhead Publishing.

Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *The Journal of Nutrition, 125(9)*, 2307-2315.

Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., & Kim, W. G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters, 579(23)*, 5157-5162.