

# Adición de *Bacillus subtilis* en parámetros intestinales en aves expuestas a Lipopolisacarido de *E.coli*

Addition of *Bacillus subtilis* in intestinal parameters of birds exposed to *E. coli* lipopolysaccharide

Recibido: 19 de septiembre de 2024 • Aprobado: 18 de octubre de 2024

## Sandra Paola Rodríguez

Profesor Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.  
Tunja, Colombia.

E-mail: sandrapaola.rodriguez@uptc.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1037-7843>

## Albeiro López Herrera

Profesor Asociado Departamento de Producción Animal Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.

E-mail: alherrera@unal.edu.co; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1444-3470>

## Jaime Eduardo Parra

Profesor Asociado Departamento de Producción Animal Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.

E-mail: jeparrasu@unal.edu.co ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4772-1326>

## Resumen

**Introducción.** La exposición de los pollos a bacterias indeseables a través del contacto con alimentos y materia fecal puede causar alteraciones en el epitelio intestinal, los antibióticos promotores del crecimiento han sido utilizados en las producciones animales, pero el uso indiscriminado, ha llevado a generar resistencia en la salud humana y animal. **Objetivo.** Establecer el efecto de la adición de *Bacillus subtilis* sobre la morfometría intestinal en aves expuestas al Lipopolisacarido de *E.coli*. **Metodología.** Se utilizaron 144 pollos machos Avian Cobb500. El período experimental tuvo una duración de 42 días. Los animales se alimentaron con una dieta comercial con y sin adición de antibiótico, LPS y *B. subtilis*:(DB): Dieta comercial sin la adición de antimicrobiano, LPS y *B. subtilis*, (D2): DB más Avilamicina, (D3): DB y 1,0µg de LPS/mg, (D4): DB y *B. subtilis* (50gr/ton alimento), (D5): DB y 1,0µg de LPS/mg y antimicrobiano, (D6): DB y 1,0µg de LPS/mg y *B. subtilis*. Se realizaron eutanasias los días 14, 28, y 42, se disectaron los segmentos intestinales, se procesaron con la técnica de Hematoxilina-Eosina para medir el alto, ancho de la vellosidad y profundidad de la cripta. **Resultados.** Se encuentra diferencia significativa estadística ( $P < 0.05$ ), entre las dietas con D3 con los mejores resultados. **Conclusión.** La suplementación con *B. subtilis* influye de manera positiva en el desarrollo de la morfometría en aves que han sido retadas a LPS de *E. coli*.

**Palabras clave:** *Bacillus*, intestinal, microbiota, vellosidad.

## Abstract

**Introduction.** Exposure of chickens to undesirable bacteria through contact with food and feces can cause alterations in the intestinal epithelium. Antibiotic growth promoters have been used in animal production, but indiscriminate use has led to resistance in human and animal health. **Objective.** To establish the effect of the addition of *Bacillus subtilis* on intestinal morphometry in birds exposed to *E. coli* lipopolysaccharide. **Methodology.** 144

male Avian Cobb500 chickens were used. The experimental period lasted 42 days. Animals were fed a commercial diet with and without the addition of antibiotic, LPS and *B. subtilis*: (DB): Commercial diet without the addition of antimicrobial, LPS and *B. subtilis*, (D2): DB plus Avilamycin, (D3): DB and 1.0 µg of LPS/mg, (D4): DB and *B. subtilis* (50 g/ton feed), (D5): DB and 1.0 µg of LPS/mg and antimicrobial, (D6): DB and 1.0 µg of LPS/mg and *B. subtilis*. Euthanasia was performed on days 14, 28, and 42, intestinal segments were dissected, processed with the Hematoxylin-Eosin technique to measure height, villus width and crypt depth. **Results.** A statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) was found between diets with D3 with the best results. **Conclusion.** Supplementation with *B. subtilis* positively influences the development of morphometry in birds that have been challenged with *E. coli* LPS.

**Keywords:** *Bacillus*, intestinal, microbiota, villus.

## Introducción

Está bien documentado que la estructura y morfología de las vellosidades juegan un papel sustancial en la digestión-absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal, y que dicho proceso es más eficiente al aumentar el tamaño y la altura de las vellosidades. Factores ambientales, nutricionales y microbianos, influyen en los índices productivos y la edad de la reproductora intervienen en la morfología de la vellosidades intestinales<sup>1</sup>. Las últimas horas de la fase embrionaria, son considerados períodos críticos y de extrema importancia para el desarrollo de las aves. Este período se caracteriza por la sucesión de diferentes eventos fisiológicos como la maduración del sistema digestivo: el aumento, y desarrollo de las vellosidades; maduración de células intestinales y la producción enzimática; y por último, el desarrollo del sistema inmunitario<sup>2</sup>.

La longitud del intestino se incrementa durante la primera semana de vida, aun en ausencia de alimento; en las siguientes dos semanas de vida en las aves, el intestino tiende a alcanzar parte de la función digestiva y de absorción. La longitud de la vellosidad y la profundidad de las criptas, se relaciona con una mayor superficie de absorción, mejor acción enzimática que facilita de esta forma el transporte y asimilación de los nutrientes<sup>3</sup>.

El crecimiento y la salud del tracto gastrointestinal son requisitos claves en la producción del pollo de engorde; sin embargo, el medio ambiente, la nutrición, los aditivos alimenticios, los estímulos inmunitarios y el equilibrio de la microbiota pueden influir en el desempeño de la producción. Por lo anterior, se consideran a las disfunciones digestivas como los factores más limitantes para el rendimiento de esta especie<sup>4</sup>.

En las producciones avícolas que presentan un manejo intensivo, las aves son sometidas a diferentes tipos de estrés que provocan desequilibrio intestinal, caracterizado por el aumento en las poblaciones patógenas, como es el caso de *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, y *Salmonella*<sup>5</sup>.

Las aves que son expuestas a LPS, muestran signos de inflamación intestinal, la cual se caracteriza por un leve edema multifocal en la submucosa, infiltración de algunos heterófilos y linfocitos en el lámina propia, y la presencia de moco y células epiteliales desprendidas en la luz intestinal<sup>6</sup>.

Durante la prohibición en los sistemas pecuarios de los antibióticos como promotores del crecimiento en algunos países, se viene prestando mucha atención a los probióticos como una alternativa a estos antibióticos. Los probióticos son bacterias beneficiosas con efectos positivos sobre la salud y la eficacia del crecimiento de los animales hospederos al mejorar la salud intestinal<sup>7</sup>.

Actualmente, los miembros de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y levadura<sup>8</sup> se utilizan principalmente como probióticos en alimentación de aves tanto de corral como de engorde y gallinas de postura. Entre estos microorganismos, los miembros del género *Bacillus sp* han sido considerados como los más prometedores, debido a la alta resistencia de las esporas a las duras condiciones del tracto gastrointestinal<sup>9-10</sup>. Estudios indican que la suplementación dietética de *Bacillus* podría tener un efecto beneficioso sobre la microbiota y la morfología intestinal, por tanto, mejoraría el rendimiento productivo y los índices de conversión alimenticia en animales<sup>11</sup>. Teniendo en cuenta lo descrito, el objetivo de esta investi-

gación fue establecer el efecto de la adición de *Bacillus subtilis* sobre la morfometría intestinal en aves expuestas a LPS de *E. coli*.

## Métodos

**Consideraciones éticas.** Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo siguiendo las guías propuestas por “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”<sup>12</sup>. Esta investigación fue avalada por El Comité Institucional Para El Cuidado Y Uso De Los Animales-CICUA de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED-013. Mayo 04 de 2016).

**Localización.** El trabajo de campo se llevó a cabo en la Estación Agraria San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ubicada en el municipio de Rionegro, vereda “El Tablacito”, localizado a 2100 msnm, temperatura entre 12 y 18°C, correspondiendo a una zona de vida bosque muy húmedo Montano bajo (bmh-MB).

**Animales.** 54 pollos machos de un día de nacidos de la línea Avian Cobb 500 se utilizaron, fueron alojados en corrales en piso. El experimento duró 42 días. La cría se llevó a cabo bajo los procedimientos experimentales de una granja comercial.

**Manejo Sanitario.** Durante la recepción de las aves se llevaron a cabo los procedimientos de preparación del galpón como se describe a continuación: lavado, limpieza y desinfección de las instalaciones, cortinas, comederos y bebederos; se realizó control de roedores e insectos con productos obtenidos en casas comerciales. Las criadoras fueron encendidas antes de la llegada de las aves, con el fin de realizar el precalentamiento del galpón a 32°C en el momento de la recepción de las aves. Durante los 42 días de experimentación se realizó de forma diaria el de aseo de comederos y bebederos, cambio de la cama cuando se encontró sucia o mojada y manejo de las cortinas dependiendo de la temperatura del galpón<sup>13</sup>.

**Dietas Experimentales.** Los animales se alimentaron con una dieta que contenía suplemento de antibiótico, LPS y *Bacillus subtilis*, y una dieta sin adición de antibiótico, las cuales se suministraron directamente en el alimento de la siguiente manera:

- Dieta Basal (DB): Dieta comercial sin antimicrobiano, LPS y *Bacillus subtilis*.
- Dieta 2 (D2): DB con adición de antimicro-

biano (Avilamicina, 10ppm).

- Dieta 3 (D3): DB con adición de *Bacillus subtilis* a razón de 50 ppm.
- Dieta 4 (D4): DB con adición de 1,0µg de LPS/mg de alimento.
- Dieta 5(D5): DB con adición de 1,0µg de LPS/mg de alimento y antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm).
- Dieta 6 (D6): DB con adición de 1,0µg de LPS/mg de alimento y *Bacillus subtilis* (50 ppm).

Se fabricó una dieta multietapa: inicio (1-21 días) y finalización (22-42 días) que llenaba los requerimientos mínimos nutricionales para la línea comercial (Rostagno *et al.* 2017). El alimento utilizado en el estudio estaba libre de antibióticos (excepto la dieta D2 y D5), donde se utilizó Avilamicina como APC, como se realiza a nivel comercial. El LPS utilizado en este estudio fue LPS *E. coli*, serotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich St Louis, MO, EE.UU.). El *Bacillus subtilis* se utilizó según la recomendación del fabricante, 50 gramos por tonelada de alimento para garantizar una dosis de 10<sup>8</sup> UFC. El alimento en los primeros 21 días del experimento fue ofrecido como alimento denominado de “Iniciación” y los siguientes 21 días se les suministró a las aves el alimento denominado de “finalización”.

**Eutanasias Humanitarias.** Durante la fase de experimentación se realizaron eutanasias escalonadas de las aves de la siguiente forma: los días 14, 28, y 42. Todas las aves se sacrificaron 2 horas y 30 minutos después de su última comida. A excepción del día 1 donde fue por dislocación cervical. Los animales estuvieron sedados por inhalación de Nitrox®, posteriormente, se llevó a cabo la eutanasia humanitaria con dióxido de carbono durante 3 minutos<sup>14</sup>.

**Evaluación de Parámetros Morfométricos Intestinales.** De las mismas aves mencionadas anteriormente, se disectaron los segmentos intestinales utilizando tijeras de disección con punta recta, así: 2 segmentos de duodeno desde el píloro hasta la porción distal de la vuelta duodenal, yeyuno desde la porción distal del giro duodenal al divertículo de Meckel, íleon desde el divertículo de Meckel hasta el inicio de los ciegos) y ciegos, cada uno con una longitud de 2cm<sup>4</sup>. Una vez cortadas estas secciones, se realizó un lavado por infusión con solución salina fría de cada porción removida para eliminar impurezas y digesta contenida<sup>14</sup>; luego se almacenaron en formol que se encontraba buferado al 10% hasta su procesamiento.

Después de 48 horas de la colecta, las muestras obtenidas del intestino delgado se enviaron a

un laboratorio privado donde se les realizó un procesamiento histotécnico; donde los tejidos fueron fijados en formol buferado al 10% por 24 horas, e incluidos en parafina, cortados a 4  $\mu\text{m}$  de espesor los cuales fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina para ser lavados, almacenados en etanol: agua (75:25, v:v) de acuerdo con el método reportado por<sup>4-14</sup>. Estos cortes fueron microdisecionados para determinar el promedio de la altura y ancho de las vellosidades intestinales, como la profundidad y ancho de las criptas.

Los cortes histológicos se analizaron cuantitativamente mediante un procesamiento de imágenes digitales computarizadas, así: la identificación de las zonas tisulares se utilizó un microscopio óptico Leica DLMB (Meyer, Houston, TX, USA), se capturaron las imágenes correspondientes con una cámara para microscopía digital instantánea Motican 2300 (Motic, Hong Kong, China) con una resolución de 3 megapíxeles, en un aumento de 200x y se analizaron dichas imágenes con el software para tratamiento de imágenes Motic Images plus2.0® (Motic, Hong Kong, China). Para la medición de las variables morfométricas, se visualizaron 10 vellosidades y sus criptas por cada campo de microscopio, de la siguiente manera:

- Altura: desde la base de la vellosidad (lámina propia), desde su punto medio se trazó una línea hasta el ápice.
- Ancho: con una línea se unieron los bordes apicales de las células epiteliales de lados opuestos, ubicadas aproximadamente en la mitad de la vellosidad.

También se determinó la profundidad y el ancho de las criptas intestinales, conforme a lo descrito previamente<sup>4</sup>:

- Profundidad: se obtuvieron trazando una línea, o segmentos continuos, desde su apertura hasta el fondo de la misma.
- Ancho: con una línea se unen los bordes apicales de las células epiteliales ubicadas

en lados opuestos, a nivel de la porción media de la cripta.

**Diseño Experimental.** El experimento se realizó con un diseño completamente al azar en un arreglo de parcelas divididas. Cada animal fue asignado a una de seis dietas experimentales. Cada uno de los tratamientos (dieta\*edad de sacrificio) con un total de 3 repeticiones. Se realizó el análisis estadístico según el procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales) PROC MIXED del SAS® software, versión 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2011).

Las diferencias entre las medias de cada tratamiento, se determinó por LS means (media de mínimos cuadrados) y se analizaron con la prueba de ANOVA. Se utilizó una prueba de Duncan para detectar significancia ( $p < 0.05$ ) entre las medias entre cada tratamiento. En este experimento no se presentó interacción estadística entre las diferentes dietas, días de evaluación y edad para las variables respuesta en el estudio, por lo tanto, no fue necesario analizar y desglosar dichos factores de manera independiente.

## Resultados

Las aves que consumieron cada una de las dietas durante el experimento no manifestaron signo alguno de enfermedad que determinara su retiro o eutanasia inmediata, además, al nivel que se fijó el suministro de alimento y agua no se generaron sobrantes.

Para la dieta DB se presenta diferencia estadística ( $P < 0,05$ ) para la altura de la vellosidad y los diferentes segmentos, así es como D2 y D3 no presentan diferencias en los segmentos duodeno y yeyuno, pero si hay diferencias estadística ( $P < 0,05$ ) al compararlas en el íleon. Para la D4 en comparación con D5 se presenta diferencia estadística ( $P < 0,05$ ) en los segmentos de duodeno e íleon y entre D5 y D6 las diferencias estadísticas se presentan en el yeyuno e íleon, datos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación de la altura ( $\mu\text{m}$ ) de las vellosidades en los diferentes segmentos intestinales de aves que consumieron las dietas experimentales.

| Altura   |                       |                        |                       |                       |                       |                        |      |
|----------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------|
| Segmento | DB                    | D2                     | D3                    | D4                    | D5                    | D6                     | EEM  |
| Duodeno  | 1317,8 <sup>A,X</sup> | 1424,5 <sup>BD,X</sup> | 1481,8 <sup>B,X</sup> | 1036,8 <sup>C,X</sup> | 1256,0 <sup>A,X</sup> | 1340,8 <sup>AD,X</sup> | 14,7 |
| Yeyuno   | 1168,0 <sup>A,Y</sup> | 1217,8 <sup>A,Y</sup>  | 1357,8 <sup>B,Y</sup> | 964,3 <sup>C,X</sup>  | 991,0 <sup>C,Y</sup>  | 1139,3 <sup>A,Y</sup>  |      |
| Íleon    | 823,8 <sup>AC,Z</sup> | 842,0 <sup>AC,Z</sup>  | 908,3 <sup>A,Z</sup>  | 665,3 <sup>B,Y</sup>  | 699,8 <sup>BC,Z</sup> | 789,0 <sup>C,Z</sup>   |      |

Dieta Basal (DB): Dieta comercial sin antimicrobiano, LPS y Bacillus subtilis; Dieta 2 (D2): DB con adición de antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 3 (D3): DB con adición de Bacillus subtilis a razón de 50 ppm; Dieta 4 (D4): DB con adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento; Dieta 5 (D5): DB con adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento y antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 6 (D6): DB con adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento y Bacillus subtilis (50 ppm). A,B,C,D Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ). x,y,z Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ). Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ). EEM: Error estándar de la media.

El cambio para la altura en las vellosidades entre cada una de las dietas y los diferentes segmentos intestinales se presentan en la tabla 2. Se observa una diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) entre segmento intestinal duodeno a los días 1 y 42 y donde se reporta mayor longitud para al día 28 y 42 al igual que para el yeyuno.

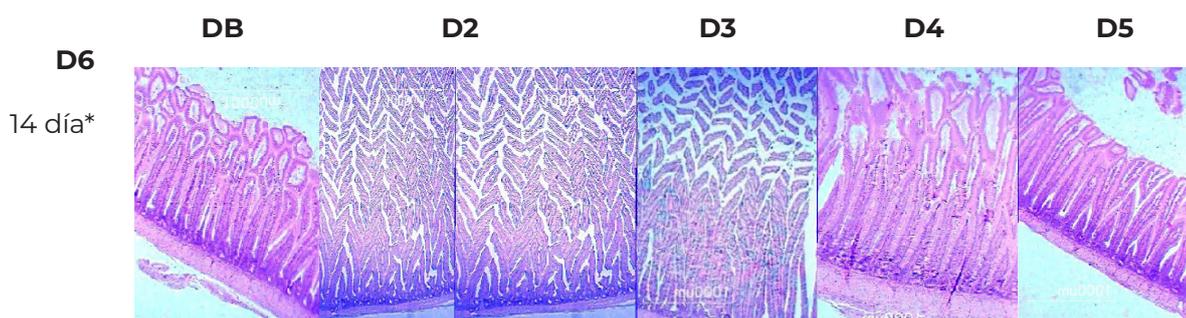
**Tabla 2.** Comparación de la altura (µm) por día de muestreo de las vellosidades en los diferentes segmentos intestinales.

| Segmento | 1                    | 14                    | 28                    | 42                    | EEM  |
|----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------|
| Duodeno  | 964,0 <sup>A,X</sup> | 1238,5 <sup>B,X</sup> | 1318,0 <sup>B,X</sup> | 1717,8 <sup>C,X</sup> | 14,7 |
| Yeyuno   | 360,0 <sup>A,Y</sup> | 1069,3 <sup>B,Y</sup> | 1448,3 <sup>C,Y</sup> | 1681,0 <sup>D,X</sup> |      |
| Íleon    | 271,0 <sup>A,Z</sup> | 657,3 <sup>B,Z</sup>  | 1036,3 <sup>C,Z</sup> | 1187,3 <sup>D,Y</sup> |      |

A,B,C,D Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ). X,Y,Z Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ). EEM: Error estándar de la media.

Para esta variable altura de la vellosidad, se encontraron diferencia estadística significativa entre los diferentes segmentos intestinales en cada una de las edades de muestreo ( $P < 0,05$ ) y el segmento intestinal duodeno mostró los valores más altos en comparación con yeyuno e íleon (figura 1).

**Figura 1.** Comparación de vellosidades intestinales (µm) de pollos de engorde que consumieron las dietas experimentales.



Dieta Basal (DB): Dieta comercial sin la adición de antimicrobiano, LPS y Bacillus subtilis, Dieta 2 (D2): DB más la adición de antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 3 (D3): DB más la adición con Bacillus subtilis se adicionó a razón de 50 ppm de alimento; Dieta 4 (D4): DB más la adición de 1,0 µg de LPS/mg; Dieta 5 (D5): DB más la adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento y antimicrobiano; Dieta 6 (D6): DB más la adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento y Bacillus subtilis a razón de 50 ppm de alimento.

\*Presencia de vellosidades en forma de zigzag para las dietas D2,D3,D4.

Para la variable ancho de las vellosidades entre cada una de las dietas y los diferentes segmentos intestinales se presentan en la tabla 3. Se presenta una diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) entre segmento intestinal y la dieta suministrada, no presentan diferencias significativa estadística ( $P < 0,05$ ) frente a la D2 en comparación con la D3 para duodeno, yeyuno e íleon;

pero si hay diferencias estadísticas entre D3 y D4; entre D4 y D5 no se presentaron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre las dietas, en D5 con la dieta D6 e

presenta los mayores valores para esta variable intestinal en aves con dietas adicionadas con el *Bacillus subtilis*.

**Tabla 3.** Comparación del ancho ( $\mu\text{m}$ ) de las vellosidades en los diferentes segmentos intestinales de aves que consumieron las dietas experimentales durante 42 días

| Segmento | DB                   | D2                   | D3                  | D4                  | D5                   | D6                  | EEM  |
|----------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|------|
| Duodeno  | 82,8 <sup>A,X</sup>  | 95,0 <sup>B,X</sup>  | 96,0 <sup>B,X</sup> | 73,3 <sup>C,X</sup> | 76,0 <sup>C,X</sup>  | 82,8 <sup>A,X</sup> | 1,12 |
| Yeyuno   | 78,5 <sup>A,X</sup>  | 82,0 <sup>AB,Y</sup> | 87,3 <sup>B,Y</sup> | 59,5 <sup>C,Y</sup> | 63,8 <sup>C,Y</sup>  | 76,5 <sup>A,X</sup> |      |
| Íleon    | 63,5 <sup>AD,Y</sup> | 82,5 <sup>B,Y</sup>  | 78,0 <sup>B,Z</sup> | 49,8 <sup>C,Z</sup> | 55,5 <sup>CD,Z</sup> | 61,8 <sup>D,Y</sup> |      |

Dieta Basal (DB): Dieta comercial sin antimicrobiano, LPS y *Bacillus subtilis*; Dieta 2 (D2): DB con adición de antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 3 (D3): DB con adición de *Bacillus subtilis* a razón de 50 ppm; Dieta 4 (D4): DB con adición de 1,0  $\mu\text{g}$  de LPS/mg de alimento; Dieta 5 (D5): DB con adición de 1,0  $\mu\text{g}$  de LPS/mg de alimento y antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 6 (D6): DB con adición de 1,0  $\mu\text{g}$  de LPS/mg de alimento y *Bacillus subtilis* (50 ppm).<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ ).<sup>xyz</sup> Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0,05$ ). Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0,05$ ). EEM: Error estándar de la media.

Con respecto para la variable ancho de la vellosidad se observa diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) para duodeno en los distintos días de edad, para el segmento yeyuno no se presenta diferencia ( $P > 0,05$ ) en los días 14 y 28 al igual que el segmento de íleon en los días 28

y 42 donde no se presentan diferencias ( $P > 0,05$ ), además de presentarse una diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) entre cada segmento intestinal y día de sacrificio siendo el día 28 y 42 donde se presenta la mayor diferencia.

**Tabla 4.** Comparación de ancho ( $\mu\text{m}$ ) por día de muestreo de las vellosidades en los diferentes segmentos intestinales.

| Segmento | 1                   | 14                  | 28                  | 42                  | EEM  |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|
| Duodeno  | 60,0 <sup>A,X</sup> | 84,8 <sup>B,X</sup> | 94,0 <sup>C,X</sup> | 98,3 <sup>D,X</sup> | 1,12 |
| Yeyuno   | 60,0 <sup>A,X</sup> | 71,2 <sup>B,Y</sup> | 75,5 <sup>B,Y</sup> | 91,7 <sup>C,X</sup> |      |
| Íleon    | 38,0 <sup>A,Y</sup> | 64,8 <sup>B,Y</sup> | 78,2 <sup>C,Y</sup> | 79,7 <sup>C,Y</sup> |      |

<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

<sup>xyz</sup> Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0,05$ ). EEM: Error estándar de la media.

Para la profundidad de la cripta, se presenta diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) a nivel del duodeno entre cada una de las dietas; entre la dieta D2 y D3 se presenta diferencia estadística para esta variable a nivel de los diferentes segmentos; entre las dietas D4, D5 y D6 se presentan diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) en la profundidad de la cripta para cada segmento

intestinal, como se presenta en la tabla 5. Para cada segmento intestinal la profundidad de la cripta presenta diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) en los días de edad de las aves. Al día 14 y 28 no se presentan diferencias ( $P > 0,05$ ) en los segmentos yeyuno, íleon y ciegos, pero en todos los segmentos si se observa diferencia ( $P < 0,05$ ) al día 42 de edad.

**Tabla 5.** Comparación de la profundidad de las criptas ( $\mu\text{m}$ ) en los diferentes segmentos intestinales de aves que consumieron las dietas experimentales.

| Segmento | DB                  | D2                  | D3                  | D4                  | D5                  | D6                  | EEM  |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|
| Duodeno  | 58,0 <sup>A,W</sup> | 44,4 <sup>B,W</sup> | 35,1 <sup>C,W</sup> | 63,3 <sup>D,W</sup> | 53,5 <sup>E,W</sup> | 48,8 <sup>F,W</sup> | 0,66 |

|        |                      |                      |                     |                      |                       |                      |      |
|--------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------|
| Yeyuno | 67,9 <sup>A,X</sup>  | 59,6 <sup>B,X</sup>  | 55,2 <sup>C,X</sup> | 75,1 <sup>D,X</sup>  | 66,3 <sup>AE,X</sup>  | 62,9 <sup>EB,X</sup> | 0,66 |
| Íleon  | 76,2 <sup>A,Y</sup>  | 65,9 <sup>B,Y</sup>  | 61,5 <sup>C,Y</sup> | 82,7 <sup>D,Y</sup>  | 72,9 <sup>AE,Y</sup>  | 71,1 <sup>E,Y</sup>  |      |
| Ciego  | 116,0 <sup>A,Z</sup> | 101,3 <sup>B,Z</sup> | 94,3 <sup>C,Z</sup> | 159,5 <sup>D,Z</sup> | 114,2 <sup>AE,Z</sup> | 110,7 <sup>E,Z</sup> |      |

Dieta Basal (DB): Dieta comercial sin antimicrobiano, LPS y *Bacillus subtilis*; Dieta 2 (D2): DB con adición de antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 3 (D3): DB con adición de *Bacillus subtilis* a razón de 50 ppm; Dieta 4 (D4): DB con adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento; Dieta 5 (D5): DB con adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento y antimicrobiano (Avilamicina, 10ppm); Dieta 6 (D6): DB con adición de 1,0 µg de LPS/mg de alimento y *Bacillus subtilis* (50 ppm).<sup>A,B,C,D</sup> Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ).<sup>xy,z</sup> Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ). Dentro de una misma fila, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ). EEM: Error estándar de la media.

## Discusión

Existen varios indicadores que describen el funcionamiento intestinal adecuado, entre ellos, la integridad de las vellosidades, por lo que se reportó que al suministrar *B. subtilis*, no presentaron significancia en las variables altura de vellosidades y profundidad de criptas, lo que sugiere un efecto positivo de los probióticos para favorecer la integridad intestinal y la función digestiva<sup>15</sup>. Lo anterior, puede corroborarse en este trabajo, ya que las aves que consumieron las dietas con suplemento de *B. subtilis* mostraron no solo un aumento de la altura y en el ancho de las vellosidades, sino, además, una disminución en la profundidad y ancho de la cripta, frente a las aves que consumieron la dieta con y sin la adición de antibióticos.

La mejora observada en las aves suplementadas con *Bacillus subtilis* durante el experimento, puede ser debido a que estos aditivos benefician al hospedero, generan un equilibrio microbiano intestinal, y modulan el sistema inmune<sup>16</sup>. El crecimiento (altura) de las vellosidades sugiere un incremento en la superficie de absorción, por ende, un alto aprovechamiento de los nutrientes disponibles y una mayor eficiencia de la alimentación<sup>17-1</sup>, tal como se evidenció en este estudio donde se desarrolló más rápido el duodeno seguido del yeyuno con el uso de *Bacillus subtilis*, mejorando la superficie de absorción de los nutrientes.

Los grupos de animales que se suplementaron con *B. subtilis*, indicaron una maduración y funcionalmente activo del epitelio intestinal a pesar del desafío con LPS. Esto a su vez, sugiere un área de superficie aumentada y mejora en la absorción de nutrientes disponible<sup>18</sup> lo que podría deberse a que el *B. subtilis* actúa de forma independiente de la infección (LPS) para mejorar así la salud e integridad intestinal. La suplementación de *B. subtilis* a pollos de engorde

incrementa los parámetros de morfometría intestinal, como son altura y, área de la cripta<sup>19</sup>. Este supuesto es apoyado por la mejora en la longitud de la vellosidad obtenida con la adición de *B. subtilis* sobre el grupo alimentado con la DB.

Cada segmento intestinal presenta un desarrollo morfométrico diferente, es así como para el íleon muestra una diferencia estadística significativa con los demás segmentos ( $p < 0,05$ ) en este estudio, tanto en altura como en ancho de sus vellosidades. Resultados similares a los que reportan<sup>20</sup>, donde el menor desarrollo de las vellosidades del íleon se relacionan a que la capa mucosa es más engrosada con el fin de mejorar la integridad de la parte final del intestino delgado, ya que impide infecciones causadas por microorganismos que puedan afectar el desarrollo y funcionamiento de este segmento intestinal. Estos resultados son similares a lo evidenciado en este estudio en relación con el reto que se realizó con LPS de *E. coli*, donde los animales expuestos a LPS mostraron signos de inflamación caracterizada por un leve edema multifocal en la submucosa; infiltración de algunos heterófilos y linfocitos en la lámina propia y; la presencia de moco y células epiteliales desprendidas en la luz intestinal<sup>6</sup>. Estos resultados pueden indicar que la adición de *B. subtilis* en la dieta puede disminuir estas lesiones debido a los efectos antimicrobianos y propiedades inmunomoduladoras de este probiótico, mejorando la velocidad de regeneración del epitelio intestinal<sup>21</sup>.

El intestino es un tejido dinámico y flexible, debido a su capacidad de alternar las tasas de proliferación celular en criptas y la rotación de enterocitos, los cuales presentan una tasa de recambio poseclósion de 4 días para duodeno e íleon, y de 2 días en yeyuno; no obstante la velocidad de renovación celular en condiciones de desafío con LPS se incrementa en un 20% con relación de las aves no desafiadas<sup>22-23-3</sup>, resul-

tados que son afines a los presentados en este trabajo donde se evidenció un mejor desarrollo del duodeno seguido del yeyuno en aves sometidas al reto del LPS de *E. coli*.

El estado funcional del intestino delgado se caracteriza en parte, por la altura de la vellosidad y la profundidad de las criptas, ya que están relacionadas a una mejor digestión de los nutrientes, de hecho, el alargamiento de las vellosidades puede brindar una mayor superficie de absorción y mejor acción enzimática para facilitar de esta forma el transporte y asimilación de los nutrientes<sup>3</sup> se relaciona esto con el uso como aditivo en la dieta de *B. subtilis*, ya que está asociado a una producción mayor de enzimas exógenas y la generación de ácidos grasos de cadena corta, lo que estimula la presentación de bacterias ácido lácticas en el lumen intestinal<sup>24</sup>. En las dietas con inclusión de *B. subtilis* se disminuyó eficazmente la inflamación, generada por la exposición al LPS, restaurando la homeostasis epitelial; la suplementación con este *Bacillus* actúa de manera positiva en el desarrollo de la vellosidad y de la cripta intestinal y, por ende, puede ser considerado como un agente modificador en beneficio en el desarrollo morfofométrico de la mucosa intestinal.

## Conclusión

La suplementación en la dieta con *Bacillus subtilis* mostró tener un efecto positivo sobre la morfometría (altura y ancho de las vellosidades; menor profundidad de la cripta) de los pollos de engorde, al compararlas con la dieta basal y con la dieta adicionada con antibiótico como promotor de crecimiento (Avilamicina).

Se recomienda al *Bacillus subtilis*, como una alternativa viable para el reemplazo de los APC, siendo un promotor del desarrollo y maduración intestinal.

## Conflicto de Intereses

El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados”.

## Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias Convocatoria 733, Gobernación de Boyacá Colombia y la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

## Referencias

- Goudarzi, M., Samiei, I., Nanekarani, S., & Nasrolahi, F. (2016). The effect of Myrtus communis oil extract on growth performance and immune responses in Ross and Cobb strain broilers. *Journal of Advanced Agricultural Technologies* Vol, 3(1).
- AHMADI, M. G.-R. M. M. H. 2017. In ovo feeding of nutrients and its impact on post-hatching water and feed deprivation up to 48 hr, energy status and jejunal morphology of chicks using response surface models, (June), 1-12. <https://doi.org/10.1111/jpn.12838> *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018 Apr;102(2):e806-e817. doi: 10.1111/jpn.12838. Epub 2017 Nov 13.
- Dabbou, S., Gai, F., Biasato, I., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Dezzutto, D., ... & Schiavone, A. (2018). Black Soldier Fly Defatted Meal As A Dietary Protein Source For Broiler Chickens: Effects On Growth Performance, Blood Traits, Gut Morphology And Histological Features. *Journal Of Animal Science And Biotechnology*, 9, 1-10.
- Barrera, M.H.; Rodriguez, S.P.; Torres, G. 2014. Efectos de la adición de ácido cítrico y un probiótico comercial en el agua de bebida, sobre la morfometría del duodeno y parámetros zootécnicos en pollo de engorde. *Orinoquia*. 18(2):52-62.
- Diaz Carrasco, J. M., Casanova, N. A., & Fernández Miyakawa, M. E. (2019). Microbiota, gut health and chicken productivity: what is the connection?. *Microorganisms*, 7(10), 374.
- Al-Aalim, A. M., Al-Iedani, A. A., & Hamad, M. A. (2021). Study of the effects of Escherichia coli lipopolysaccharide on innate immunity: The expression profile of TLR4 and CD14 genes in rat liver. *Open Veterinary Journal*, 11(4), 771-779.
- Kazemi, S. A., Ahmadi, H., & Karimi Torshizi, M. A. (2019). Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(5), 1399-1407.
- Guo, M., Wu, F., Hao, G., Qi, Q., Li, R., Li, N., ... & Chai, T. (2017). *Bacillus subtilis* improves immunity and disease resistance in rabbits. *Frontiers in immunology*, 8, 354.

9. Al-Khalaifa, H., Al-Nasser, A., Al-Surayee, T., Al-Kandari, S., Al-Enzi, N., Al-Sharrah, T., ... & Mohammed, A. (2019). Effect of dietary probiotics and prebiotics on the performance of broiler chickens. *Poultry science*, 98(10), 4465-4479.
10. Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 87, 820-828.
11. Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X., & Liu, Z. (2019). Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. *Aquaculture*, 500, 65-74.
12. COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES, CIOMS. 2012. International guiding principles for biomedical research involving animals. Disponible desde Internet en: [https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding\\_principles\\_2012.pdf](https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf) (con acceso el 09/07/2019).
13. COBB-VANTRESS INC. 2009. Guía de Manejo del Pollo de Engorde. Aviagen. 65p.
14. Maya-Ortega, C. A., Madrid-Garcés, T. A., & Parra-Suescún, J. E. (2022). *Bacillus subtilis* mejora el desarrollo de órganos digestivos, la morfología del intestino y el rendimiento productivo en pollos de engorde. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 25(2).
15. Guo, L. X., Nie, F. R., Huang, A. Q., Wang, R. N., Li, M. Y., Deng, H. Y., ... & Ji, Y. D. (2021). Transcriptomic analysis of chicken immune response to infection of different doses of Newcastle disease vaccine. *Gene*, 766, 145077.
16. Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Hannas, M.I.; Donzele, J.L.; Sakomura, N.K.; Perazzo, F.G.; Brito, C. DE O. 2017. Tablas brasileñas para aves y cerdos. Composición de alimentos y requerimientos nutricionales. Universidad Federal de Viçosa. 488p.
17. Chen, C., Wang, Z., Li, J., Li, Y., Huang, P., Ding, X., ... & Yin, Y. (2019). Dietary vitamin E affects small intestinal histomorphology, digestive enzyme activity, and the expression of nutrient transporters by inhibiting proliferation of intestinal epithelial cells within jejunum in weaned piglets. *Journal of animal science*, 97(3), 1212-1221.
18. Li, J.; Li, J.; Zhang, S.Y; Li, R.X.; Lin, X.; Mi, Y.L.; Zhang, C.Q. 2018. Culture and characterization of chicken small intestinal crypts. *Poultry Science*. 97(5):1536-1543. <https://doi.org/10.3382/ps/pey010>
19. Qiu, P., Ishimoto, T., Fu, L., Zhang, J., Zhang, Z., & Liu, Y. (2022). The gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 733992.
20. Kazemi, S. A., Ahmadi, H., & Karimi Torshizi, M. A. (2019). Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(5), 1399-1407.
21. Lyte, J. M., Keane, J., Eckenberger, J., Anthony, N., Shrestha, S., Marasini, D., ... & Lyte, M. (2021). Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a novel model to study the relationship between the avian microbiome and microbial endocrinology-based host-microbe interactions. *Microbiome*, 9, 1-24.
22. Sangalli, G. G., Eyng, C., Spindola, M., Nunes, R. V., Broch, J., Savaris, V. L., ... & Köhler, T. L. (2021). Performance, bone characteristics, and physiological parameters of broilers fed nutrient-restricted diets supplemented with multicarbohydase complex associated with high levels of phytase. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(2), 100141.
23. Reicher, N., Melkman-Zehavi, T., Dayan, J., Wong, E. A., & Uni, Z. (2022). Nutritional stimulation by in-ovo feeding modulates cellular proliferation and differentiation in the small intestinal epithelium of chicks. *Animal Nutrition*, 8, 91-101.
24. Ciurescu, G., Dumitru, M., Gheorghe, A., Untea, A. E., & Drăghici, R. (2020). Effect of *Bacillus subtilis* on growth performance, bone mineralization, and bacterial population of broilers fed with different protein sources. *Poultry science*, 99(11), 5960-5971.