

Effect of a dry fermented product on morphological, immunological, histological and health indicators of broilers

Efecto de un producto fermentado seco (PFS) en indicadores morfológicos, inmunológicos, de salud e histológicos de pollos de ceba

Lourdes Savón¹, B. Sánchez¹, A. Elías^{†1}, H.J. Ortega^{†1}, M. Gutiérrez², Idania Scull¹ and Magalys Herrera¹

L. Savón: 0000-0001-9880-0310

¹*Instituto de Ciencia Animal, km 47 ½ Carretera Central, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Código Postal 32700*

²*Centro de Producción de Animales de Laboratorio, Calle Tercera 407593 entre Sexta Carretera Tirabeque, Boyeros, La Habana, Cuba*
Email: lsavon@ica.co.cu

To determine the effect of the inclusion of a dry fermented product, prepared from ruminal content, on the morphological, immunological, health and histological indicators of broilers, 32 EB24 hybrid male animals, with 42 days of age, were used. Broilers were distributed according to a completely randomized design with eight repetitions per treatment: control of corn/soybean and three experimental diets including 1, 2 and 3 % of the dry fermented product. Morphological indicators (relative weights, g/gLW x 100) of digestive organs, accessory organs of the gastrointestinal tract (GIT) were determined, as well as other immunological (spleen, thymus and bursa of Fabricius) and histological indicators. Health indicators (hematocrit) and serum concentrations of total proteins, uric acid, cholesterol, triglycerides and glucose were also analyzed. The dry fermented product did not alter the relative weights of organs of full and empty gastrointestinal tract, nor that of accessory organs and lymphoids. There was increase of relative weight of spleen ($P=0.0693$), which corresponded with an increase in hematocrit, in broilers that received up to 3% of the dry fermented product. Protein metabolism indicators did not vary with the inclusion of the dry fermented product, which influenced on energy metabolism, with an increase of 6.85 vs. 9.52 and 10.21 of serum glucose ($P<0.0091$ mmol/L) for 2 and 3 % of dry fermented product, with a decrease of 0.84 vs. 0.52 and 0.54 ($P<0.0032$ mmol/L) of triglycerides regarding the control. An elongation of villi of the small intestine mucus and a hyperplasia of cecal tonsils was observed, which could indicate better nutrient absorption and possible immunostimulatory effect. Results suggest that the inclusion of up to 3 % of the dry fermented product in the diet of broilers based on corn/soybean, favors health and histological indicators of these animals.

Keywords: *fermentation, ruminal content, lymphoid organs, histology, broilers*

Ruminal content is a by-product obtained from this organ that, at the moment of the death of the bovine, contains all the material that was not digested. It has a complete balance of amino acids, fat, minerals and vitamins of B complex and C vitamin, besides some unidentified growth factors (Sugiarto 2014). For years, this material has been discarded, although it is, due to its high organic load, of great environmental impact. This residue also has a large number of microorganisms (fungi, protozoa and bacteria) living in symbiosis in the rumen (Dairio *et al.* 2005). For all the above, it is an alternative for feeding broilers and fattening pigs,

Se utilizaron 32 pollos híbridos machos EB24 de 42 días de edad para determinar indicadores morfológicos, inmunológicos, de salud e histológicos al incluir en la dieta un producto fermentado seco (PFS) que se elaboró a partir del contenido de rumen. Las aves se distribuyeron según diseño completamente aleatorizado con 8 repeticiones por tratamiento: control de maíz/soya y tres dietas experimentales con inclusión de 1, 2 y 3 % del PFS. Se determinaron los indicadores morfológicos (pesos relativos, g/gPVx100) de los órganos digestivos, accesorios del tracto gastrointestinal (TGI), inmunológicos (bazo, timo y bolsa de Fabricio) e histológicos. También se analizaron indicadores de salud (hematocrito) y las concentraciones séricas de proteínas totales, ácido úrico, colesterol, triglicéridos y glucosa. El PFS no alteró los pesos relativos de los órganos del TGI lleno y vacío, de los órganos accesorios, y linfoides. Se halló incremento del peso relativo del bazo ($P=0.0693$) en las aves que recibieron hasta el 3 % del PFS, que se correspondió con incremento del hematocrito. Los indicadores del metabolismo proteico, no variaron con la inclusión del PFS, el que influyó en el metabolismo energético con incremento $P<0.0091$ (mmol/L) 6.85 vs 9.52 y 10.21 de la glucosa sérica para el 2y 3% del PFS con una disminución $P<0.0032$ (mmol/L) 0.84 vs 0.52 y 0.54 de los triglicéridos en comparación con el control. Se observó la elongación de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado y una hiperplasia de los tonsiles cecales, lo que pudiera indicar la mejor absorción de nutrientes y posible efecto inmunoestimulante. Se sugiere que la inclusión de hasta 3 % de PFS en la dieta de pollos de ceba basada en maíz/soya, resulta favorable para indicadores de salud e histológicos de estos animales

Palabras clave: *fermentación, contenido de rumen, órganos linfoides, histología, pollos de ceba*

El contenido del rumen es un subproducto que se obtiene del sacrificio de ganado bovino el cual al momento de su muerte contiene todo el material que no alcanzó a ser digerido. Posee un balance completo de aminoácidos, grasa, minerales y vitaminas del complejo B y vitamina C, además de algunos factores de crecimiento no identificados (Sugiarto 2014) y por años se ha desechado y produce alto impacto ambiental debido a su alta carga orgánica. Este residuo también posee gran cantidad de microorganismos que viven en simbiosis en el rumen como hongos, protozoos y bacterias (Dairio *et al.* 2005) y pueden ser aprovechados. Por esto se puede

rabbits and ruminants, due to its chemical, biological and bromatological characteristics, and a wide availability (Ríos and Ramírez 2012).

On the other hand, fermentation is one of the oldest technologies used for improving food quality (Kim 2012). Nowadays, there is a great variety of fermented products for animal feeding (Beruvides 2019).

The objective of this research was to determine the effect of a dry fermented product (PFS), obtained from ruminal content, on morphological, immunological, health and histological indicators of broilers.

Materials and Methods

Preparation of the dry fermented product (PFS). The PFS was produced with the use of a liquid fermented product (PFL) mixed with corn meal (1:1) weight/volume (w/v), according to Gutiérrez (2005) procedure. It was dried under the sun for 48-72 h and manually removed every 2 hours to avoid the development of undesirable reactions. Once the product was dried, it was packed into two paper bags for later use. Three samples of 500 g were taken from each bag of dry product prepared in July 2015 in the Food Production Laboratory of the Department of Digestive and Biochemical Physiology, Institute of Animal Science. A sample was taken from three different locations in the bag (low, medium, top) and mixed to form a single sample. This process was repeated three times for each bag, to obtain a total of six samples (three from each bag). Later, the PFS was taken to a hammer mill to obtain a particle size of 1 mm.

Chemical analysis. The chemical analysis was performed according to the methodology of AOAC (2010). True protein determinations were carried out according to Bernstein (1924), modified by Meir (1986). Fiber fractioning (neutral detergent fiber, acid detergent fiber, lignin and cellulose) was determined according to the procedure of van Soest *et al.* (1991). Calcium, magnesium and potassium were determined by atomic absorption spectrophotometry, and phosphorus was determined by Amaral (1972).

Animals and diets. An amount of 32 male broilers (EB24), of 35 days old, were used, which came from an experiment of productive performance. Animals were distributed in four experimental treatments: 1) control treatment (without the fermented food) and treatment II, III and IV with 1, 2 and 3 % of PFS, respectively. During the time of experimentation, animals had free access to water and food. The experimental diets were formulated according to the requirements of Rostagno (2011), as it is shown in table 1.

At 42 d of age, 8 broilers were selected per treatment for control treatment and 6 for experimental treatments. They were weighed and the indicators shown in the experimental procedure were determined.

Morphometric indicators of digestive, accessory

decir que es una alternativa para la alimentación de, pollos y cerdos de engorde, conejos y ruminantes por sus características químicas, biológicas, bromatológicas y su amplia disponibilidad (Ríos and Ramírez 2012).

Por otra parte, la fermentación es una de las tecnologías más antiguas que se ha utilizado para la mejorar la calidad de los alimentos (Kim 2012) En la actualidad, se producen una gran variedad de productos fermentados que se utilizan en la alimentación animal (Youling *et al.* 2011, Douyan 2015 y Beruvides 2018).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de un producto fermentado seco (PFS) obtenido a partir de contenido de rumen, en indicadores morfológicos, inmunológicos de salud e histológicos de pollos de ceba

Materiales y Métodos

Elaboración del PFS. El producto fermentado seco (PFS) se elaboró a partir de la mezcla del producto fermentado líquido (PFL) con harina de maíz (1:1) peso/volumen (p/v) según el procedimiento de Gutiérrez (2005). El producto se secó al sol durante 48-72 h (Solano *et al.* 2003) y se removió cada dos horas de forma manual, para evitar el desarrollo de reacciones indeseables. Una vez seco el producto, el lote se envasó en dos sacos de papel para su utilización posterior. Se tomaron tres muestras de 500 g de cada saco del producto seco que se elaboró en el julio de 2015 en el Laboratorio de Producción de Alimentos del departamento de Ciencias Biofisiológicas, del Instituto de Ciencia Animal. El muestreo se realizó tomando el producto de tres lugares de los sacos (bajo, medio, arriba) y se mezclaron para conformar una muestra. El proceso se repitió tres veces en cada saco, para obtener en total seis muestras (tres de cada saco) Posteriormente, el PFS se pasó por un molino de martilló para obtener un tamaño de partícula de un milímetro

Análisis químico. El análisis químico, se realizó de acuerdo con la metodología de la AOAC (2010). Se realizaron determinaciones de proteína verdadera según Bernstein (1924) modificado por Meir (1986). El fraccionamiento de la fibra (fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina y celulosa) se determinó según el procedimiento de Van Soest *et al.* (1991). El calcio, magnesio y potasio se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica. El fósforo se determinó por Amaral (1972).

Animales y dietas. Se utilizaron 32 pollos de ceba machos (EB24) de 35 días de edad que procedieron de un experimento de comportamiento productivo. Los animales se distribuyeron en cuatro tratamientos experimentales. Estos fueron: 1) tratamiento control (sin el alimento fermentado) y tratamiento II, III y IV con el 1, 2 y 3 % del PFS, respectivamente. Durante todo el tiempo de experimentación los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento. Las dietas experimentales se formularon según los requerimientos de Rostagno (2011) y se muestran en la tabla 1.

A los 42 días de edad se seleccionaron 8 aves

Table 1. Composition of experimental diets. Broiler, finishing stage (36-42 days).

Ingredients	Treatments			
	Corn/soybean	Corn/soybean 1 % PFS	Corn/soybean 2 % PFS	Corn/soybean 3 % PFS
Corn meal	62.4	61.523	60.068	59.068
Soybean meal	30.018	29.615	29.68	29.677
Dry Fermented Product	0	1	2	3
Plant oil	3.6	4	4.5	4.6
Monocalcium phosphate	1	0.95	0.95	0.95
Calcium carbonate	1.2	1.11	1	0.9
Salt	0.45	0.45	0.45	0.45
Methionine	0.152	0.157	0.162	0.165
Lysine	0.05	0.065	0.06	0.06
Choline	0.13	0.13	0.13	0.13
Premix ²	1	1	1	1
Calculated contribution (%)				
CP	18	17.99	18	18
CF	2.68	2.64	2.62	2.61
ME ¹	12.97	12.95	12.94	12.84
P disp.	0.326	0.32	0.32	0.32
Ca	0.717	0.713	0.712	0.715
Meth+Cyst	0.708	0.706	0.707	0.707
Lis	0.99	0.99	0.99	0.986
Na	0.2	0.2	0.2	0.2

¹ it is expressed in Mj/kg

²Each kg contains vitamin A, 13,500 IU; vitamin D3, 3,375 IU; vitamin E, 34 mg; B2, 6 mg; panthotenic acid, 16 mg; nicotinic acid, 56 mg; Cu, 2,000 mg; folic acid, 1.13mg; vitamin B12, 32µg; Mn, 72 mg; Zn, 48mg

and immunological organs. Broilers were sacrificed two hours and thirty minutes after food ingestion, according to the method of jugular vein bleeding, described by Sánchez (1990). Subsequently, the abdominal cavity was opened and accessory organs (liver and pancreas) and digestive tract were removed. For analysis, the latter was divided into crop, proventriculus, gizzard, small intestine, caeca and final portion (colon and rectum). In addition, immunological organs were extracted (thymus, spleen and bursa of Fabricius).

Digestive organs were weighed, full and empty (the digestive content was removed by moving the index and thumb fingers to empty them) in a SARTORIUS technical balance. Data of immune, accessory and digestive organs were expressed as relative weight (g/g LWx100). Liveweight (LW) was established at the time of sacrifice (Giambrone 1996).

Indicators of health and blood biochemistry. Blood samples were taken directly from the jugular vein, tilting the tube slightly, so that the blood could roll down the walls. This avoids serum hemolysis, which will be used later. Two sets of collection tubes were used: one for the determination of total blood, and another for obtaining serum. Total blood was placed at room temperature until

por tratamiento para el tratamiento control y 6 para los tratamientos experimentales, se pesaron y se les determinaron los indicadores que muestra el procedimiento experimental siguiente:

Indicadores morfométricos de órganos digestivos, accesorios e inmunológicos. Las aves se sacrificaron dos horas y treinta minutos después de la ingestión de alimento por el método de desangrado de la vena yugular descrito por Sánchez (1990). Posteriormente, se abrió la cavidad abdominal y se extrajeron los órganos accesorios (hígado y páncreas) y el tubo digestivo. Este último se dividió para su análisis en buche, proventrículo, molleja, intestino delgado, ciegos y porción final (colon y recto). También se extrajeron los órganos inmunológicos (timo, bazo y bolsa de Fabricio).

Los órganos digestivos se pesaron llenos y vacíos (se eliminó el contenido digestivo desplazando los dedos índice y pulgar para vaciarlos) en una balanza técnica marca SARTORIUS. Los datos de los órganos digestivos, accesorios e inmunes se expresaron como peso relativo (g de órgano/g peso vivo x100). El peso vivo (PV) se estableció en el momento de sacrificio (Giambrone 1996)

Indicadores de salud y de la bioquímica sanguínea. La muestra de sangre se tomó directamente de la vena yugular, inclinando ligeramente el tubo de colección, de forma que ésta rueda por las paredes. De esta

clot retraction was achieved. Later, it was centrifuged at 3000 rpm for five minutes to obtain the serum. Hematocrit was directly determined from total blood by Wintrobe method.

Blood biochemistry indicators (cholesterol, glucose, triglycerides, total proteins, albumin and uric acid) were determined in blood serum by an automatic Cobas integra 400 PLUS (Roche Diagnostic System).

Histological analysis. For microscopic examination, eight samples of 1 cm² were taken from each organ for control treatment, and six from each organ for the remaining treatments (1, 2 and 3 % PFS). All samples were stored in formalin at 4 % for histological analysis and gently shaken to remove remains of adherent intestinal content. Fixing process consisted of dehydration with staggered ethanol solutions (50, 70, 80, 96 and 100 %) and cleaning with xylol. The organs were appropriately sized (CENPALAB 2000) and included in paraffin (POT.05.03.003). Subsequently, they were cut (CENPALAB 2000a) (POT.05.03.005) with the use of equipment designed for this purpose (microtome). Cuts were spread in sheets and then they were stained with hematoxylin-eosin (Scheure and Chalk 1986) (POT.05.03.015) (CENPALAB 2000b). The histological sections were examined with an Axioplan-2 optical microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany).

Statistical analysis. A completely randomized design was used with four treatments, consisting of experimental diets and eight repetitions/treatment. For the analysis of results, the computerized statistical package INFOSAT 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used. In the necessary cases, mean values were compared using Duncan (1955) test.

Results and Discussion

No differences were observed among treatments applied for liveweight. This result could be related to food intake, which did not differ among treatments. That is, PFS did not influence on this indicator. There were no differences in morphometric indexes of full and empty organs of the gastrointestinal tract (GIT) of broilers that consumed different levels of PFS (tables 2 and 3).

In this regard, Gutiérrez (2005) also found no effect on relative weights of empty digestive organs of the gastrointestinal tract of broilers that received doses of 0.5, 1.0, 1.5 and 2 % of a dry fermented product, (Vitafert).

Relative weight of the GIT accessory organs was similar among treatments (table 4). This means that PFS does not increase the specific functions of these organs in the release of enzymes to digest and absorb nutrients and in the excretion of bile and cellular metabolism, respectively. As a consequence, the values of these indicators did not differ from the control. These results also agree with those obtained

forma se evita la hemólisis del suero que se utilizará posteriormente. Se utilizaron dos juegos de tubos de colección; uno para la determinación de sangre total y otro para la obtención del suero. La sangre total se colocó a temperatura ambiente hasta lograr la retracción del coágulo. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante cinco minutos con el objetivo de obtener el suero. El hematocrito se determinó directamente de la sangre total mediante el método de Wintrobe.

Los indicadores de la bioquímica sanguínea; colesterol, glucosa, triglicéridos, proteínas totales, albúmina y ácido úrico se determinaron en el suero sanguíneo mediante un analizador automático Cobas integra 400PLUS (Roche Diagnostic System).

Análisis histológico. Para el examen microscópico se tomaron ocho muestras de 1 cm² de cada órgano para el tratamiento control y seis de cada órgano para los tratamientos restantes, (1, 2 y 3 % PFS). Todas las muestras se conservaron en formol al 4 % para el análisis histológico y se agitaron suavemente para eliminar restos de contenido intestinal adherente. El proceso de fijación consistió en la deshidratación con soluciones escalonadas de etanol (50, 70, 80, 96 y 100 %), la limpieza con xilol. Los órganos se tallaron adecuadamente (CENPALAB 2000) y se incluyeron en parafina (POT.05.03.003). Posteriormente se cortaron CENPALAB (2000a) (POT.05.03.005) con la utilización del equipo diseñado para tal efecto (micrótopo). Los cortes se extendieron en láminas y a continuación se procedió a la tinción de rutina hematoxilina-eosina (Scheure y Chalk 1986) (POT.05.03.015) (CENPALAB 2000b) Las secciones histológicas se examinaron con un microscopio óptico Axioplan-2 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Alemania).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos que consistieron en las dietas experimentales y ocho repeticiones/tratamiento. Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico computarizado INFOSAT 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Los valores medios se compararon mediante la dócima de Duncan (1955) en los casos necesarios.

Resultados y Discusión

No se observaron diferencias entre los tratamientos empleados para el peso vivo. Este resultado pudiera estar relacionado con el consumo de alimentos, que no difirió entre tratamientos, es decir, el PFS no influyó en este indicador. No se observaron diferencias en los índices morfométricos de los órganos del TGI lleno y vacío de los pollos de ceba que consumieron diferentes niveles de PFS (tablas 2 y 3).

Al respecto, Gutiérrez (2005) tampoco encontró efecto en los pesos relativos de los órganos digestivos vacíos del tracto gastrointestinal de pollos de ceba que recibieron dosis de 0,5, 1.0, 1.5 y 2% de un producto fermentado seco (Vitafert).

El peso relativo de los órganos accesorios del TGI también fueron similares entre tratamientos (tabla 4). Ello

Table 2. Relative weight (g/g LWx100) of full digestive organs of the GIT of broilers that consume PFS

Indicators	PFS levels %				±SE and Sign
	Control (0)	1	2	3	
Live weight, g	1959.33	2048.33	1991.61	2023.33	71.38 P=0.8095
GIT	9.19	9.70	9.01	8.76	0.35 P=0.3182
Crop	0.55 0.09	0.58 0.08	0.51 0.08	0.50 0.089	P=0.9190
Proventriculus	0.63	0.60	0.56	0.54	0.03 P=0.4123
Gizzard	3.20	2.67	2.49	2.81	0.26 P=0.2891
Small intestine	3.98 0.18	4.21 0.21	3.96 0.18	3.86 0.18	P=0.6524
Caeca	0.81	1.05	0.78	0.88	0.10 P=0.2679
Colon-rectum	0.31	0.27	0.22	0.27	0.03 P=0.4695

Table 3. Relative weight (g/g LWx100) of empty digestive organs of the GIT of broilers that consume PFS.

Indicators	PFS levels %				±SE and Sign
	Control (0)	1	2	3	
Live weight, g	1959.33	2048.33	1991.61	2023.33	71.38 P=0.8095
GIT	6.69	5.56	6.17	6.35	0.36 P=0.2102
Crop	0.36 0.04	0.39 0.04	0.37 0.04	0.38 0.04	P=0.9676
Proventriculus	0.59	0.54	0.53	0.49	0.39 P=0.4221
Gizzard	2.29	1.96	1.99	2.17	0.14 P=0.3161
Small intestine	3.15 0.14	3.15 0.15	3.00 0.14	2.97 0.14	P=0.6770
Caeca	0.43	0.43	0.46	0.49	0.04 P=0.7294
Colon-rectum	0.23	0.20	0.19	0.23	0.02 P=0.5995

by Gutiérrez (2005), with the dry fermented product Vitafert, and with reports of Elkafi *et al.* (2015), who analyzed a dry mixture of bovine blood and fermented ruminal content.

Immunological indicators. No differences were observed among treatments in the relative weights of the bursa of Fabricius and thymus with the inclusion of PFS (table 5). As it is demonstrated, relative weight of the bursa of Fabricius had values between 0.18 and 0.27, so the animals were immunocompetent. Regarding Giambrione (1996), this condition is reached when the relation between absolute weight of the organ and liveweight is between 0.20 and 0.30.

significa que el PFS no incrementa las funciones específicas de estos órganos en la liberación de enzimas para digerir y absorber los nutrientes y en la excreción de bilis y el metabolismo celular, respectivamente. Como consecuencia, los valores de estos indicadores no difirieron del control. Estos resultados concuerdan también con los obtenidos por Gutiérrez (2005) con el producto fermentado Vitafert seco y con Elkafi *et al.* (2015) los que analizaron una mezcla seca de sangre bovina y contenido de rumen fermentado.

Indicadores inmunológicos. No se observó diferencias entre tratamientos en los pesos relativos de la bolsa de Fabricio y el timo con la inclusión de PFS (tabla 5). Como se observa, el peso relativo de la bolsa de Fabricio

Table 4. Effect of PFS on relative weight (g/g LWx100) of accessory organs of the GIT of broilers

Indicators	PFS levels (%)				± SE and Sign
	0 (control)	1	2	3	
Live weight, g	1959.33	2048.33	1991.61	2023.33	71.38 P=0.8095
Liver	2.26	2.18	2.24	2.02	0.08 P=0.2303
Pancreas	0.22	0.23	0.22	0.20	0.02 P=0.8694

According to this author and Contreras and Fernández (1999), the immune system of broilers undergoes evolution, and the main organs of immunity are the bursa and the thymus, during the first stage of life. In the first, B lymphocytes are produced, responsible for humoral immunity (production of antibodies by B lymphocytes), and the second organ is responsible for cell-mediated immunity (production of cytokines and cells by T lymphocytes). Peripheral tissues of the immune system in broilers are spleen, cecal tonsils, Harder glands and bone marrow. These are populated by B and T lymphocytes during broiler growth. When these animals approach maturity, the bursa and thymus involve, and the immunocompetence of broilers starts depending on the peripheral immune system.

presentó valores entre 0.18-0.27, por lo que animales se hallaban inmunocompetentes. De acuerdo con Giambrone (1996) esta condición se alcanza cuando la relación entre el peso absoluto del órgano respecto al peso vivo se halla entre 0.20-0.30. Según este investigador y Contreras y Fernández (1999), el sistema inmune de las aves sufre una evolución, y son la bolsa y el timo en una primera etapa de la vida, los órganos centrales de la inmunidad, en el primero se producen los linfocitos B encargados de la inmunidad humoral (producción de anticuerpos por linfocitos B) y el segundo encargado de la inmunidad mediada por células (producción de citoquinas y células por linfocitos T). Los tejidos periféricos del sistema inmune en las aves son el bazo, los tonsiles cecales, las glándulas de Harder y la médula ósea, los que son

Table 5. Relative weights of lymphoid organs (g/gLWx100) and hematocrits (%) of broilers receiving PFS in the diet

Indicators	PFS levels %				±SE y Sign	1-β Test potency
	Control (0)	1	2	3		
Live weight, g	1959.33	2048.33	1991.61	2023.33	71.38 P=0.8695	8%
Bursa of Fabricius	0.21	0.27	0.18	0.24	0.03 P=0.2971	30%
Thymus	0.50	0.51	0.55	0.49	0.07 P=0.9401	7%
Spleen	0.13	0.14	0.19	0.17	0.01 P=0.0693	61%
Hematocrit	31.17 ^a	32.16 ^{ab}	33.66 ^b	32.83 ^{ab}	0.59 P=0.045	72%

^{a,b} Different letters within the same line differ significantly (P< 0.05) (Duncan 1955)

*P<0.05

The relative weight of the spleen did not differ statistically among treatments. However, from a biological point of view, it was observed that broilers that received 2 % of PFS in the diet, had superior relative weight (P = 0.0693). When analyzing the potency of the test, it was observed to be 61 %, which is low so the fact that no statistical differences were found for P<0.05, several factors inherent to sampling could have influenced, such as sample size or errors inherent to sampling that were not controlled, as in the weighing of the organ, due to the adhered fat that was not removed, among other factors. In any case,

poblados durante el crecimiento de las aves por los linfocitos B y T. Cuando las aves se acercan a la madurez, la bolsa y el timo involucionan y la inmunocompetencia del ave pasa a depender del sistema inmune periférico.

El peso relativo del bazo no difirió estadísticamente entre tratamientos, pero si se halló desde el punto de vista biológico que los pollos que recibieron el 2 % de PFS en la dieta tenían mayor peso relativo (P=0.0693.) Al analizar la potencia de la dócima se observó que esta era de 61 %, que es una potencia baja por lo que el hecho de no encontrar diferencias estadísticas para P<0.05 pudieron influir varios factores como el tamaño de muestra o errores

the highest relative weight of the spleen, confirmed by a high hematocrit content, could indicate an immunostimulatory response to the inclusion of PFS. As it is known, this product, made from fermented ruminal liquor content, contains metabolites called "tertiary metabolites", such as polysaccharides, bacteriocins and enzymes that could promote this action.

The hematocrit was maintained in the normal physiological ranges for the species (Meluzzi *et al.* 1992), although it was higher ($P = 0.045$) for 2 % of PFS with respect to the control treatment (table 5). This result was expected, since if the spleen is a hematopoietic organ, the increase in its relative weight should correspond to the increase in blood counts.

Indicators of blood biochemistry. The study of blood biochemistry showed that serum indicators of protein metabolism: total proteins, albumin and uric acid, as well as the albumin/globulin (A/G) ratio, did not vary with the inclusion of PFS in the diet of broilers (table 6). However, the product influenced significantly on energy metabolism indicators.

Levels of 2 and 3 % of PFS increased serum blood glucose ($P < 0.0091$) compared to control and 1 % of PFS, which were similar to each other. Increase in serum cholesterol ($P < 0.0204$) was observed with PFS levels. This corresponded with the decrease in triglycerides from 0.84 to 0.54mmol/L.

Related to these results, glucose represents the most important sugar in carbohydrate metabolism in all vertebrates. It is the carbohydrate that circulates through blood toward different organs and body tissues that use it as an energy source (D'Mello 1995). In conventional diets for broilers and laying hens, starches (amylose and amylopectin), present in corn, wheat, and soybean constitute the main source of circulating blood glucose (Gunsberg *et al.* 1998, cited by Miranda López *et al.* (2007). Circulating glucose values in blood plasma of broilers are in the range of 8.4-10.1mmol/L (Miturka *et al.* 1977). Table 6 shows that only broilers of the treatments with 2 and 3 % of PFS showed glucose levels in the normal ranges. This means, perhaps, that PFS levels of 2 % and above provide different organs and body tissues with the energy needed to perform their functions.

On the other hand, the increase obtained in serum cholesterol levels with PFS suggests that this product, despite constituting a mixture of microorganisms mainly composed by yeasts and lactic bacteria, did not show a hypocholesterolemic activity for this species (broilers). Similar results were obtained by Pérez (2000), when doses of 50, 75 and 100 mL of yeast hydrolyzed were tested. With regard to control, this author did not observe a decrease in serum cholesterol in treated broilers. It should be noted that the liver is the main organ of lipid metabolism of broilers. It is the main seat of lipogenesis, where cholesterol

inherentes al muestreo que no se controlaron, como en el pesaje del órgano si la grasa adherida que presenta no se eliminó completamente, entre otros. De todas formas, el mayor peso relativo del bazo corroborado por un mayor contenido de hematocrito, pudiera indicar una respuesta inmunoestimulante a la inclusión del PFS. Como se conoce, este producto elaborado a partir de contenido líquido de rumen fermentado contiene metabolitos denominados "metabolitos terciarios" como polisacáridos, bacteriocinas, y enzimas que pudieran propiciar esta acción.

Por otra parte, el hematocrito se mantuvo en los rangos fisiológicos normales para la especie (Meluzzi *et al.* 1992), aunque fue superior ($P = 0.045$) para el 2 % de PFS en comparación con el tratamiento control (tabla 5). Este resultado era esperado, ya que si el bazo es un órgano hematopoyético, un incremento de su peso relativo se debe corresponder con un aumento de las células hemáticas.

Indicadores de la bioquímica sanguínea. El estudio de la bioquímica sanguínea mostró que los indicadores séricos del metabolismo proteico: proteínas totales, albumina y ácido úrico, así como la relación albúmina/globulina (A/G) no variaron al incluir PFS en la dieta de pollos de ceba (tabla 6). Sin embargo, se halló que el producto si influyó significativamente en los indicadores del metabolismo energético.

Así, se encontró que los niveles de 2 y 3 % del PFS incrementaron la glucosa sanguínea sérica ($P < 0.0091$) en comparación con el control y el 1% de PFS, los que fueron similares entre sí. Se observó un incremento del colesterol sérico ($P < 0.0204$) con los niveles de PFS, que se correspondió con una disminución de 0.84 a 0.54mmol/L de los triglicéridos.

En relación con estos resultados, la glucosa representa el azúcar más importante en el metabolismo de los carbohidratos en todos los vertebrados. Este es el carbohidrato que circula vía sanguínea a los diferentes órganos y tejidos corporales quienes lo emplean como fuente energética (D'Mello 2000) En dietas convencionales para pollos de engorde y gallinas ponedoras, los almidones (amilosa y amilopectina) presentes en el maíz, trigo, y soya, constituyen la fuente principal de glucosa sanguínea circulante (Gunsberg *et al.* 1998, citados por Miranda López *et al.* (2007). Los valores circulantes de glucosa en el plasma sanguíneo de los pollos de engorde se encuentran en el rango de 8.4-10.1mmol/L (Miturka *et al.* 1977). Si se observa la tabla 6, sólo las aves de los tratamientos 2 % y 3 % de PFS mostraron niveles de glucosa en los rangos normales. Esto quizás significa que niveles 2 % y superiores de PFS propician la energía necesaria a los diferentes órganos y tejidos corporales para realizar sus funciones.

Por otro lado, el incremento que se observó en los niveles de colesterol sérico con el PFS, conduce a pensar que éste a pesar de constituir una mezcla de microorganismos entre ellos levaduras, y bacterias lácticas no manifestó una actividad hipocolesterolemica para esta especie (pollos de ceba). Resultados similares obtuvo Pérez (2000) cuando ensayó dosis de 50, 75 y 100 mL

is synthesized and triglycerides constitute its main product (Martínez 2004).

de hidrolizado de levadura y no observó disminución del colesterol sérico de las aves tratadas en respecto al control.

Tabla 6. Indicators of blood biochemistry of broilers receiving PFS in the diet

Indicators ^{1,2}	PFS levels %				±SE y Sign
	Control (0)	1	2	3	
A/G	0.71	0.73	0.65	0.67	0.04 P=0.6050
Albumin, g/L	12.06	11.25	11.85	12.91	0.75 P=0.5090
Cholesterol, mmol/L	3.11 ^a	3.15 ^a	3.62 ^{ab}	4.10 ^b	0.23 P=0.0242
Glucose, mmol/L	6.85 ^a	6.77 ^a	9.52 ^b	10.21 ^b	0.64 P=0.0091
Total Proteins, g/L	29.13	27.19	30.31	32.10	1.83 P=0.3300
TG mmol/L	0.84 ^b	0.61 ^a	0.52 ^a	0.54 ^a	0.06 P=0.0032
AU, mmol/L	354.25	378.25	399.38	358.00	32.76 P=0.7580
				35.02	

¹TG = triglycerides; AU= uric acid, A/G= Albumin /Globuline relation

²a,b. Different letters in the same line differ at P<0.05 (Duncan (1955))

Histological analysis. Generally, lymphoid tissue hyperplasia, associated with mucous membranes in the cecum (cecal tonsils) was observed in all treatments with PFS compared to control group. Cecal tonsils, spleen and Harder gland are part of the immune system, and are likely to favor an immunostimulatory action (figures 1 and 2).

With respect to intestine (duodenum), in all the treatments where PFS was included, an apparent elongation of villi was observed. Height of villi and depth of the crypt are important indicators of intestinal health of animals, and are directly related to the absorption capacity at mucus level (Buddle and Bolton 1992) (figures 3 and 4). The increase of villi height, as well as their diameter, means superior surface area for nutrient absorption (Sklan and Noy 2003, Wang and Peng 2008 and Rodríguez 2012). A morphometric indicator that could be related to nutrient absorption surface is relative length of the small intestine. Unfortunately, this indicator was not measured. Results suggest that the inclusion of up to 3 % of the dry fermented product in the diet of broilers based on corn/soybean, favors health and histological indicators of these animals.

Hay que destacar que el hígado es el principal órgano del metabolismo lipídico de las aves, es el asiento principal de la lipogénesis, en él se sintetiza el colesterol y además, su principal producto son los triglicéridos (Martínez 2004).

Análisis histológico. De manera general, se observó una hiperplasia del tejido linfoide asociada a mucosas en el ciego (tonsiles cecales) en todos los tratamientos con el PFS respecto al grupo control. Los tonsiles cecales, el bazo, la médula de Harder forman parte del sistema inmune y es probable que favorezcan una acción inmunoestimulante (figuras 1 y 2).

Con respecto al intestino (duodeno) se observó en todos los tratamientos donde se incluyó el PFS una aparente elongación de las vellosidades. La altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta son importantes indicadores de la salud intestinal de los animales y están directamente relacionadas con la capacidad de absorción a nivel de la mucosa (Buddle y Bolton 1992) (Figuras 3 y 4) El incremento en la altura de las vellosidades así como su diámetro se traduce en una mayor área de superficie para la absorción de nutrientes (Sklan y Noy 2003, Wang y Peng 2008, Rodríguez 2012). Un indicador morfológico que pudiera relacionarse con la superficie de absorción de nutrientes es la longitud relativa del intestino delgado, desafortunadamente, este indicador no se midió. Se sugiere que la inclusión de hasta 3 % de PFS en la dieta de pollos de ceba basada en maíz/soya resulta favorable en indicadores de salud e histológicos de estos animales

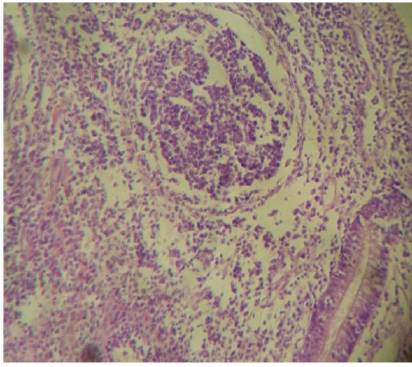


Fig. 1. Control group, animal 1. Normal caecum. HE 20x

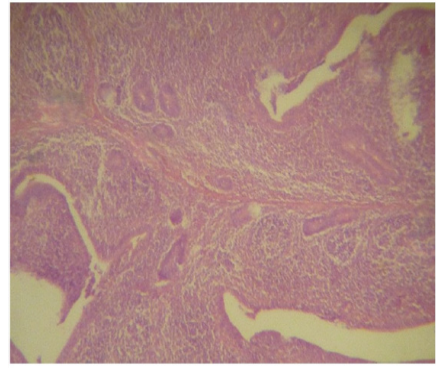


Fig. 2. Treatment 1, animal 19. Caecum hyperplasia. HE 20x

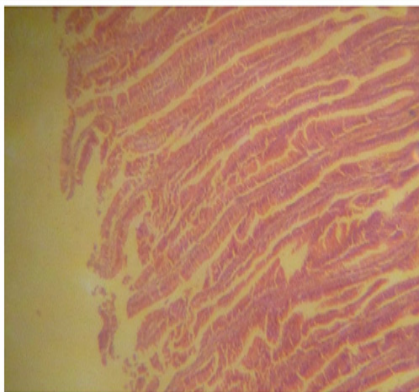


Fig. 3. Control group, animal 9. Duodenum with normal villi. HE 20x

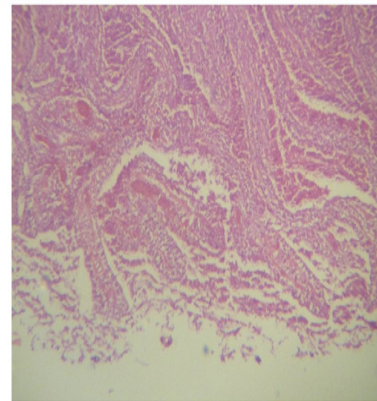


Fig. 4. Treatment 2, animal 13. Elongation of intestinal villi

References

- Amaral, A. 1972. "Técnicas analíticas para evaluar macronutrientes en ceniza de caña de azúcar". Laboratorio de Nutrición de la Caña, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba, p. 35
- AOAC. 2010. Official Methods of Analysis. 18th Ed. (3rd Rev.). Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, U.S.A
- Beruvides, A. 2019. Efecto del aditivo zootécnico Vitafert en la respuesta biológica de crías y precebas porcinas. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal-Universidad Agraria de la Habana., San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 100
- Buddle, J.R. & Bolton, J.R. 1992. The pathophysiology of diarrhoea in pigs. *Pig News and Information*, 13: 41N-45N, ISSN: 0143-9014
- POT.05.03.003 (inclusion de parafina). 2000. Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba
- POT.05.03.00. (corte con micrótopo). 2000. Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba
- POT.05.03.03.015 (tinción con hematoxilina-eosina). 2000. Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba
- Contreras, M. & Fernández, J.F. 1999. Entidades inmunosupresoras y su correlación con otras condiciones patológicas y de la crianza. *Industria Avícola*, Marzo: 29-34
- Dairo, F.A.S., Aina, O.O. & Asafa, A.R. 2005. "Performance evaluation of growing rabbits fed varying levels of rumen content and blood rumen content mixture". *Nigerian Journal of Animal Production*, 32(1): 67-72, ISSN: 0331-2062
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat. Available: <http://www.infostat.com.ar>
- D'Mello, J. 1995. Leguminous leaf meals in non ruminant nutrition. In: *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. D'Mello, J. & Devendra, C. (eds). Ed. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom, p. 247, ISBN: 085198926
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006341X, DOI: 10.2307/3001478
- Elkafi, M.A., Abelatti, K.A. & Malik, H.E. 2015. Effect of dietary dried rumen content on broiler performance of plasma constituents and carcass characteristics. *Global Journal of Scientific Research*, 3(1): 264-270, ISSN: 2311-732X
- Gao, D. & Lin, D. 2015. Method for preparing animal feed by fermentation of rumen microorganism. Patent CN09146060 A-205-12-16. China National Intellectual Property Administration and Trademark Office (CNIPA), China
- Gao, Y., Li, C., Qian, G. & Wang, C. 2011. Preparation method of fermentable vegetable protein. Patent CN101965903 A-2011-02-09, China National Intellectual Property Administration and Trademark Office (CNIPA), China

- Giambro, J.J. 1996. "Inmunosupresión en las aves: causas y prevención". *Veterinaria Argentina*, 13: 735–738, ISSN: 0326-4629
- Gutiérrez, R. 2005. Efecto de la utilización de residuales avícolas fermentados (Vitafert) y su posible efecto probiótico en los indicadores fisiológicos y productivos de pollos de ceba. MSc. Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 65
- Kim, P. 2012. *Wickerhamomyces anomalus* inoculated barley in wet fermented feed for pigs. MSc. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
- Martínez, M. 2004. Efecto de un hidrolizado enzimático de crema de destilería tratado térmicamente en indicadores del metabolismo lipídico en reemplazo de ponedoras. MSc. Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
- Meir, H. 1986. *Laborproktibuire. Tiermahrungund, futtermitten fur Tiererproduzente Verlag*, Berlín
- Meluzzi, A., Primiceri, G., Giordani, R. & Fabris, G. 1992. "Determination of blood constituents reference values in broilers". *Poultry Science*, 71(2): 337–345, ISSN: 0032-5791, DOI: 10.3382/ps.0710337
- Miranda, S., Rincón, H., Muñoz, R., Higuera, A., Arzálluz, A. M. & Urdaneta, H. 2007. "Parámetros productivos y química sanguínea en pollos de engorde alimentados con tres niveles diéticos de harina de granos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Durante la fase de crecimiento." *Revista Científica FCV-LUZ*, 17(2): 150–160, ISSN: 0798-2259
- Mitruka, B.M. & Rawnsley, H.M. 1977. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals*. Ed. Masson Publishing Inc, New York, U.S.A., p. 140-142, ISBN: 0893520663
- Osorio, J.H. & Flores, J.D. 2018. "Comparación de lípidos sanguíneos entre pollos de engorde y gallinas ponedoras". *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 65(1): 27–35, ISSN: 0120-2952
- Osorio, J.H. & Flórez, J.D. 2011. "Diferencias bioquímicas y fisiológicas en el metabolismo de lipoproteínas de aves comerciales". *Biosalud*, 10(1): 88–98, ISSN: 1657-9550
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
- Ríos, Milton & Ramírez, H. 2012. "Aprovechamiento del contenido ruminal bovino para ceba cunicola, como estrategia para diezmar la contaminación generada por el matadero en San Alberto". *Prospectiva*, 10(2): 56–63, ISSN: 2216-1368
- Rodríguez, J.C. 2012. "Respuesta morfométrica intestinal de pollos alimentados con diferentes niveles de morera (*Morus alba*)". *Revista Citecsa*, 3(4): 28–37, ISSN: 2027-6745
- Rostagno, H., Albino, L.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., de Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A. & de Toledo, S.L. 2011. *Tablas Brasileñas para Aves y Cerdos. Composición de Alimentos y Exigencias Nutricionales*. Horacio Rostagno (ed). 3rd Ed. U.F.V Viosa, Brasil, p. 250
- Sánchez, A. 1990. *Enfermedades de las aves*. Ed. ENPES, La Habana, Cuba, p. 285
- Scheuer, J.P., & Chalk, T.B. 1986. *Clinical tests: Histology*. Ed. Wolfe Medical Publishing. Ltd, The Netherlands
- Sklan, D. & Noy, Y. 2003. "Functional development and intestinal absorption in the young poult". *British Poultry Science*, 44(4): 651–658, ISSN: 0007-1668, DOI: 10.1080/00071660310001618325
- Sugiarto, A., Rosyedi, D. & Hasanuddin, A. 2014. Protein digestibility performance and carcass quality of broilers chickens fed with supplements with centrifugated rumen contents. *Livestock Reserach for Rural Development*, 26(2), Available: <http://www.lrrd.org/lrrd26/2/sugi26031.htm>
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition". *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583–3597, ISSN: 00220302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Wang, J.X. & Peng, K.M. 2008. "Developmental morphology of the small intestine of African ostrich chicks". *Poultry Science*, 87(12): 2629–2635, ISSN: 1525-3171, DOI: 10.3382/ps.2008-00163
- Wintrobe, M.M. 1974. *Clinical Hematology*. 7th Edition. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, U.S.A, ISBN: 0812104145

Received: September 4, 2018

Accepted: September 5, 2018