UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollos de engorde

Liliana Lucía Betancourt López

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2012

Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollos de engorde

Liliana Lucía Betancourt López

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Producción Animal

Director:

Ph.D. Germán Afanador Téllez

Codirector:

Ph.D. Gonzalo Díaz González

Línea de Investigación:

Nutrición Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2012

Agradecimientos

Doctor Germán Afanador, quien ha sido mi constante apoyo y mi maestro incondicional

Doctora Claudia Ariza, Laboratorio de Nutrición, CBB, Corpoica, por su acompañamiento y facilitar toda la logística de los laboratorios y unidad experimental de avicultura para la ejecución de los experimentos.

Doctor Fernando Rodríguez, Laboratorio de Microbiología Molecular, CBB Corpoica, por ser más que un facilitador de los mecanismos de investigación.

Doctor Michael E. Hume, USDA-ARS, FFSRU, College Station, Texas, USA por compartir sus conocimientos en técnicas moleculares para el estudio del metagenoma intestinal.

Doctor Scott E. Dowd, USDA-ARS Livestock Issues Research Unit, Lubbock, Texas, por su colaboración en el procesamiento de muestras por pirosecuanciación.

Doctor Gustavo García, director de Investigaciones, Corpoica, por su apoyo logísico para la realización de experimentos.

Doctora Rocío Patiño, Laboratorio de Microbiología, Corpoica Ceisa, pos sus aportes en la determinación de la actividad antibacterial.

Vienvialy Phandanouvong, Investigador Corpoica, por sus conocimientos compartidos y respaldo en los análisis de microbiología molecular.

Doctor Gonzalo Díaz, Laboratorio de Toxicología, Univesidad Nacional de Colombia, por su constante apoyo y enseñanzas magistrales.

Doctores: Edgar Oviedo, Olga Lucía Mayorga, William Narváez Solarte, Fernando Ariza, Carlos Manrique, Aureliano Hernández, Alejandro Corzo, por contribuir con mi proceso de formación como evaluadores.

Guillermo Torrez, Biólogo del IBUN, Universdiad Nacional de Colombia, por su colaboración en el procesamiento de datos de pirosecuenciación.

Zootecnistas: Alexander Padilla, Milena Hernandez, Alexander Umaña, Yesid Avellaneda, Daniel Rodriguez, Ronnal Ortíz por el soporte en experimentos de campo y laboratorio.

Stella Rodriguez, Leonardo Sanchez, Javier Sanchez, Asistentes de Investigación, Corpoica, por el soporte en experimentos de campo y por su amistad.

Rocío Rojas, Laboratorio de Toxicología, por su acompañamiento y amistad.

Amparo Cortés, Laboratorio de Toxicología, por su amistad y apoyo incondicional.

Vanessa Otero, Melisa Nuñez y todo el personal de apoyo del Laboratorio de Microbiología en Corpoica, Tibaitatá.

Nidia Rojas, Laboratorio de Nutrición, Universidad de La Salle, por su colaboración.

Doctor Luis Enrique Cuca, Director del Laboratorio de Fitoquímica, Universidad Nacional de Colombia, por compartirme su experiencia en fitoquímica.

Doctora Elena Stashenko, Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, por permitir la publicación de los resultados.

A la Universidad de La Salle, por facilitar y hacer posible mis estudios.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Corpoica, Universidad de La Salle, Universidad de Nariño, asociación Vencedores del Verano, por la financiación y participación en la investigación.

A mi esposo y mis hijos por todo el tiempo que dejamos de compartir y por su comprensión y apoyo.

Resumen

Los aceites esenciales de orégano (AEO) se han propuesto como aditivos naturales para su uso en pollos de engorde, existiendo diferentes químiotipos que reflejan una amplia biodiversidad, sobresaliendo el tipo carvacrol. El objetivo de esta investigación fue la evaluación de la composición, el efecto antibacteriano *in vitro* y actividad funcional *in vivo* de tres quimiotipos de AEO: tipo carvacrol (*Origanum vulgare* ssp *hirtum,* OH), tipo-timol (*Origanum vulgare L* (OL) y *Lippia Origanoides,* LO) y tipo-sabineno (*Orianum majorana,* OM) en sistemas de alimentación de pollos de engorde bajo diferentes ambientes de producción. Aunque la menor concentración bactericida de los AEO estuvo asociada con el mayor contenido de carvacrol y timol, el mejor desempeño productivo, digestibilidad ileal de energía y grasa fue observada con el AEO del quimiotipo OM. La suplementación de los quimiotipos del género *Origanum* evaluados (OH, OL y OM) produjo cambios significativos de la comunidad microbiana presente en las fracciones del tracto intestinal cuando se compararon con el tratamiento control y el suplementado con antibióticos. Los AEO atenuaron las diferencias en el perfil microbiológico del intestino delgado respecto a los ciegos y el colon. Los aceites esenciales del tipo LO produjeron un efecto diferente cuando los pollos de engorde se expusieron a ooquistes de coccidia. Se observó una interacción entre el nivel de inclusión de AEO y el reto ($P<0.01$) con un nivel óptimo sobre el peso corporal de machos a los 35 días de edad en pollos retados de 147 ppm, mientras que en pollos no retados fue 65 ppm, lo cual sugiere un efecto dual del AEO sobre esta variable. La inclusión de 100 ppm AEO en pollos retados permitió tener un perfil microbiológico comparable al grupo control no retado, mostrando el efecto antimicrobiano de este tipo de AEO. Sin embargo, la inclusión de AEO en pollos no retados generó un perfil microbiológico similar al grupo de pollos retados sin inclusión de AEO, lo cual sugiere un efecto deletéreo de este tipo de AEO, en sistemas limpios de producción. Los AEO permitieron controlar Estreptococcacea, Faecalibacterium, Pseudomonales, *Clostridium* y *Salmonella*. Los aceites esenciales de *L. Origanoides* tipo-timol se constituyen en una alternativa económicamente viable para el desarrollo y producción de un aditivo natural para pollos de engorde.

Palabras clave: bactericida, digestibilidad, *Lippia*, metagenómica intestinal, *Salmonella*

Abstract

Oregano essential oils (OEO) have been proposed as natural additives for use in broilers, with different chemotypes that reflect a wide diversity within which the type carvacrol is more important. The objective of this study was to evaluate the composition and *in vitro* and *in vivo* activity of three oregano chemotypes, carvarol-type (*Origanum vulgare* ssp *hirtum,* OH), thymol-type (*Origanum vulgare L* (OL) y *Lippia Origanoides,* LO) and sabinene-type (*Orianum majorana,* OM) on broiler feeding system at different production conditions. The best productive performance and energy and fat ileal digestibility was observed with OM chemotype, despite the lower OEO bactericidal concentration was associated with the highest carvacrol and thymol. Significant changes in the microbial community of intestinal tract fractions were found due to supplementation of *Origanum vulgare* gender (OH, OL and OM) OEO chemotypes, when they were compared with control and antibiotic treatments. Differences between foregut and hindgut microbial profile were attenuated. Different effect of *L. origanoides* essential oils on broiler chicken challenged with coccidia attenuated ooquistes was showed. An interaction between OEO level inclusion and challenge was observed ($P<0.01$), 147 ppm was the OEO optimal level inslusion that optimized the body weight in challenged broiler chickens, while to broiler chickens non challenged was 65 ppm. A similar cecum microbiologic profile of cecum broiler chickens challenged compared to control treatment when 100 ppm of OEO were supplemented. However, a microbiologic profile similar to broiler chicken challenged non OEO treated was founded when non-challenged broiler chickens were supplemented with OEO. The OEO allowed controlling Estreptococcacea, Faecalibacterium, Pseudomonales, *Clostridium* and *Salmonella. Lippia origanoides* essential oils high-thymol are an economically viable alternative to development and production of natural additive for broiler chickens

Keywords: bactericidal, digestibility, gut metagenomics, *Lippia*, *Salmonella*.

Contenido

		Pág.
Introducción General		1
Capítulo 1	Revisión de Literatura	6
1.1	La ecología del tracto gastrointestinal (TGI) y el uso de APC	7
1.2	Técnicas microbiológicas para monitorear las comunidades del TGI	9
1.3	Los aceites esenciales de orégano (AEO) como una alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento	13
1.4	Propiedades bioactivas de los AEO	15
1.5	Mecanismos de acción antibacterial de los AEO	17
1.6	Otros aspectos funcionales de los AEO de importancia para la industria animal	20
Capítulo 2	Actividad antibacterial y composición de los aceites esenciales de orégano de diferentes zonas climáticas de Colombia	33
Capítulo 3	Efecto de la suplementación con aceites esenciales de orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde	50
Capítulo 4	Efecto de la suplementación con aceites esenciales de orégano sobre la microflora digestiva y el comportamiento productivo de pollos de engorde machos	75
Capítulo 5	Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de orégano *Lippia origanoides* Kunth en pollos de engorde	97
Capítulo 6	Efecto de aceites esenciales de orégano (*Lippia origanoides* Kunth) sobre la microbiota cecal de pollos de engorde por análisis metagenómico	117
Discusión General		145
Conclusiones y trabajo futuro		153

Introducción General

Los aditivos alimenticios han sido usados ampliamente en la producción de pollos de engorde desde el comienzo de su producción a escala hacia los años 50 (Moore et al., 1946). En particular, los antibióticos promotores de crecimiento han tenido una posición relevante en este desarrollo por su contribución al mejoramiento del crecimiento y la eficiencia de producción de las aves (Peterson et al., 1991; Rosen, 1995). Recientemente, estas tendencias han marcado un punto de inflexión debido a la preocupación de diferentes actores sociales sobre la resistencia de una gama de cepas de bacterias a los antibióticos, la baja disponibilidad de antibióticos efectivos para uso en medicina humana y la dificultad para controlar brotes de enfermedades bacterianas (Wilson y Kenyon, 2002). Esta situación ha desbordado a reexaminar el porqué en algunos nichos experimentales no se han observado diferencias significativas en el crecimiento, la mortalidad y la conversión de alimento, con la suplementación de antibióticos promotores (Proudfoot et al., 1990) y a recabar en algunas evidencias que muestran efectos deletéreos que incluyen niveles significativos de mortalidad y enfermedad (Newman y Scheuren-Portocarrero, 2005).

Los aspectos relacionados con esta problemática en el área de la Salud Pública están asociados con el consumo de la carne de pollo, como ruta potencial de entrada de bacterias resistentes (Hinton, 1988), resistencia que una vez establecida en una población bacteriana es mantenida por largos períodos de tiempo, aún en ausencia de una presión selectiva de los antibióticos (Newman y Scheuren-Portocarrero, 2005). En consecuencia, en algunos países, especialmente en la Comunidad Económica Europea se ha restringido el uso de antibióticos promotores de crecimiento, lo cual ha caracterizado un nuevo escenario de reto en la gestión tecnológica, con un incremento en las entidades patológicas entéricas, afectando los indicadores de mortalidad, de comportamiento y bienestar de las aves, con un aumento en la prescripción de los antibióticos a nivel terapéutico (Andreasen, 2000).

La problemática descrita ha estimulado diferentes procesos de investigación, desarrollo e innovación relacionados con la disponibilidad en el mercado de aditivos alimenticios alternativos que cubran espacios integrales en la salud de los pollos de

engorde, su comportamiento en crecimiento y los valores agregados en términos de calidad del producto. Las siguientes innovaciones cubren en términos globales las expectativas de selección de aditivos alimenticios: prebióticos, probióticos, ácidos orgánicos, enzimas y productos naturales con características multifuncionales, como los aceites esenciales.

Los aceites esenciales tienen un amplio rango de actividades y han sido usados en la medicina no tradicional humana y animal, inicialmente por la presión de los consumidores por consumir productos con sello verde y posteriormente por los resultados obtenidos con productos solos o combinados y por extractos en la producción y el mejoramiento del estado sanitario de las aves (Li, 1998). En estos desarrollos sobresalen los estudios realizados *in vitro* con aceites esenciales de orégano, basados en sus principales sustancias con actividad fitogénica como: el carvacrol y el timol (Wenk, 2003). La más importante característica de estas sustancias es que son seguros, y en este contexto, son utilizados comúnmente como ingredientes en pastas dentales, gomas de mascar, fragancia y procesamiento de alimentos, por lo que los extractos de orégano son categorizados como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), por la FDA de los Estados Unidos (Silva et al., 2005).

La hipótesis de este proyecto de tesis es que los aceites esenciales de orégano (AEO) pueden estimular selectivamente el crecimiento y/ o la actividad de bacterias benéficas intestinales, con unos efectos estructurales sobre la salud del tracto intestinal de pollos de engorde y con unos valores agregados en conjunto no sólo sobre el comportamiento de los pollos en un ciclo comercial, sino sobre la calidad de la canal producida.

Los objetivos de esta investigación fueron: Comparar la composición de aceite esencial de tres subespecies de orégano cultivados comercialmente y una variedad nativa de Colombia. Determinar la concentración mínima inhibitoria de estos aceites esenciales frente a los microorganismos, *Salmonella, Eschericia coli, Lactobacillus acidophilus y Bibidobacterium breve.* Determinar el grado de asociación de los cambios en la morfometría epitelial de duodeno y yeyuno con parámetros productivos en pollos de engorde por efecto de la suplementación de tres quimiotipos de AEO. Monitorear los cambios en la comunidad microbiológica en términos de coeficientes de similaridad de la huella genética de la microflora de intestino mediante electroforesis en gel congradiente

denaturante (DGGE, por sus siglas en inglés) por efecto de la suplementación con estos quimiotipos de orégano. Evaluar la respuesta sobre el consumo de alimento, ganancia de peso corporal, conversión de alimento y mortalidad de pollos de engorde en función de la suplementación de tres quimiotipos de AEO. Finalmente, evaluar el efecto de diferentes niveles de inclusión de AEO a partir de un quimiotipo nativo del Alto Patía y en condiciones de reto con ooquistes vacunales de coccidia, sobre el desempeño productivo y un análisis metagenómico de la comunidad microbiológica de ciegos.

En esta investigación se describen trabajos relacionados con experimentos realizados *in vitro*, *in situ* e *in vivo* con aceites esenciales de orégano (AEO) nativos de un nicho de producción natural de Colombia, el Valle del Alto Patia, los cuales se compararon con otro bloque de AEO producidos a una escala comercial del orégano como condimento en Colombia y con AEO de origen griego, el cual predomina y está posicionado en el mercado internacional. Los resultados de estos experimentos se reportan en seis capítulos a saber:

En el capitulo 1 se realiza una revisión inventarial y crítica sobre el uso de aceites esenciales en sistemas de alimentación de aves. Describe el impacto de la comunidad microbiológica del tracto gastrointestinal sobre la salud y producción de las aves, el manejo tradicional del balance productivo mediante antibióticos promotores de crecimiento (APC). Profundiza en el uso de técnicas microbiológicas y en el progreso metodológico de las mismas. La importancia, el efecto y los mecanismos de acción de los AEO como alternativa al uso de antibióticos.

En el capítulo 2 se presenta la composición de diferentes quimiotipos de aceites esenciales de orégano y su actividad antibacterial *in vitro*. Hace referencia a dos tipos de AEO, 3 quimiotipos del género *Origanum*, procedentes de cultivo comercial en Sabana de Bogotá y *Lippia origanoides* Kunth, un quimiotipo nativo del Alto Patía, utilizando como control, el AEO procedente de Grecia. Se evaluó la composición por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en engles) y la concentración mínima bactericida por dilución en caldo y posterior confirmación de cultivo en agar.

En el capítulo 3 se describe el efecto de la suplementación con 200 ppm de diferentes quimiotipos de AEO cultivados en Sabana de Bogotá, sobre la digestibilidad

ileal mediante el uso de Cr_2O_3 como indicador inerte, la micrometría del epitelio de las distintas fracciones del tracto gastointestinal y su relación con los parámetros productivos en pollos de engorde, mantenidos en jaulas.

El capítulo 4 presenta los resultados de la evaluación del experimento descrito en el capítulo 3 sobre los cambios en el perfil microbiológico de las distintas fracciones del tracto gastrointestinal monitoreado por DGGE.

En el capítulo 5 se muestra los resultados de la evaluación de diferentes niveles de inclusión de aceite esencial de *Lippia origanoides* Kunth en pollos de engorde inoculados con ooquistes vacunales de coccidia sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde, fraccionamiento en canal y análisis de ingreso neto parcial de la producción de carne de pollo en el proceso de producción.

En el Capítulo 6 se describen los resultados del experimento planteado en el capítulo 5 sobre la comunidad microbiológica de los ciegos monitoreados por la técnica de pirosecuenciación y mediante análisis metagénomico se describe con más precisión la abundancia, la riqueza y la diversidad de los distintos grupos taxonómicos identificados.

En el último capítulo se hace una discusión general que permite visualizar el proceso sistemático de evaluación de los AEO disponibles en Colombia, cultivados y nativos con diversa composición como aditivos alternativos multifuncionales en el crecimiento y el comportamiento productivo de los pollos de engorde, finalizando con conclusiones.

Biblografia

Andreasen, M. 2000. Consequences of the ceased used of growth promoters presented at DVHS 2000, 4th and 5th May 2000, Denmark.

Hinton, M. H. 1988. Antibiotics, poultry production and public health. World´s Poult Sci. J. 44: 67-69.

Li, C. M. 1998. Chinese herb feed additives (in Chinese). Beijing: Chinese Agricultural University Press. No. ISBN 7-81002-360-8.

Moore, P. R., A. Evenson, T.D. Luckey, E. McCoy, C. A. Elvehjem, and E. B. Hart. 1946. Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. J. Biol. Chem. 165: 437-441.

Newman, M. C. and S. M. Scheuren-Portocarrero. 2005. Multiple antibiotic resistance: what is the cure? In: TP Lyons and Jacques (ed) Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proc. Alltech's 21 st Annual symposium. University Press. Nottingham.

Peterson, R. A., G. H. Carpenter, W. T. Jones, and J. A. Kla. 1991. Effect of tetracycline hydrochloride and oxytetracycline hydrochloride given way drinking water on early mortality of broiler chicks from twenty eight week old dams. Poult. Sci. 70: 1040-1042.

Proudfoot, F. G, E. D Jackson, and H. W. Hulan. 1990. The response of male chicken broilers to the dietary addition of virginamycin. Poult. Sci. 69: 1713-1717.

Rosen, G. D. 1995. Antibacterials in poultry and pig nutrition, in: Wallace, R.J. & Chesson, A. (eds). Biotechnology in Animal Feeds and Feeding, Weinheim, Germany. pp. 143-172.

Silva, R., N. Vazquez, and T. Dunford. 2005. Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J Essent Oil Res. 17: 668-671.

Wenk, C., 2003. Herbs and botanicals in the nutrition of monogastric animals. 9. Syposium ‘‘Vitamine und Zusatzstoffe in der Erna¨hrung von Mensch und Tier am 24.und 25.09. Jena/Thu¨ ringen, 45–60.

Wilson, S., and S. Kenyon. 2002. Avilamycin and mannanoligosaccharide as feed additives for broilers. (BOCM PAULS, Ipswich, UK.) Pages 114- 115. in: Proc. 11th European Poult. Sci. Conf., Bremen, Germany. Sept., 6-10.

CAPÍTULO 1

Revisión de Literatura

El balance de la microflora intestinal es un factor determinante de la funcionalidad, el metabolismo, la respuesta inmune, la salud y la expresión productiva de los animales. Desde el comienzo de la industria avícola, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (APC) ha hecho posible el desarrollo de sistemas intensivos de producción de pollos de engorde (Visek, 1978; Hernández et al. 2004). Sin embargo, esta práctica hasido cuestionada por lorganismos de salud pública y consumidores por la posible prevalencia de bacterias resistentes y la potencial falla terapéutica en humanos y animales (WHO, 1997; Knarreborg et al., 2002; Mathew et al., 1998). Año tras año, el uso de APC en el alimento de los animales, se ha venido restringiendo en diversos países de Europa (Ten y Raine, 2006) y es así como desde 2006, la Unión Europea bajo un principio de precaución, prohíbe el uso de APC, lo cual ha acarreado aparentemente una reducción del comportamiento productivo del pollo de engorde. Sin embargo, experiencias de países como Suecia sugieren que es posible alcanzar unos índices de producción, con altos rendimientos y competitividad, sin el uso de APC aplicando al proceso productivo unas buenas condiciones de manejo (Wierup, 1998). En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (2001) valora esta experiencia y concluye que se puede prescindir de los APC “en condiciones de producción similares a las suecas”.

En este contexto, se ha creado la necesidad y el reto de generar nuevas alternativas naturales que tengan el mismo o similar efecto a los APC. Dentro de estas alternativas se encuentran los aceites esenciales, que son compuestos volátiles de plantas medicinales que tienen propiedades multifuncionales, sobresaliendo su actividad antimicrobiana. En particular, los aceites esenciales de orégano (AEO), han demostrado tener propiedades antibacterianas y antioxidantes (Botsoglou et al., 2002; Ultee et al., 2002), como estimulantes de la secreción de enzimas digestivas (Lee et al., 2003), coccidiostáticos (Gianenas et al., 2003), antimicóticos, antivirales, inmunoestimulantes, estimulantes del apetito y controladores de desórdenes digestivos y respiratorios (Lavabre, 1990). Los anteriores efectos demuestran una amplia multifuncionalidad y

sinergismo de los compuestos de los aceites esenciales de orégano (AEO), convirtiéndolos en una alternativa de reemplazo de los APC, permitiendo potenciar el desempeño funcional integral del sistema digestivo y la expresión productiva del pollo de engorde. Estos efectos funcionales han sido atribuidos al contenido de los fenoles: carvacrol y timol en rangos que van desde 3% hasta 75% del total del aceite; con la presencia de otros componentes como monoterpenos hidrocarbonados; γ-terpineno y ρ-cimeno (Aligiannis et al., 2001).

1.1. Ecología del tracto gastrointestinal (TGI) y el uso de APC

El TGI es un sistema complejo, constituido por el alimento ingerido, sus constituyentes y contaminantes; la población microbiana residente y transitoria, los nutrientes endógenos y secreciones y los órganos accesorios como: hígado, vesícula biliar y páncreas (Korver, 2006). El componente más importante del TGI es la población de microorganismos, la cual representa entre el 1 y 2% del peso corporal (Pedroso et al., 2005). La microflora del TGI está constituida por una diversa población compuesta principalmente por bacterias (Dibner y Richards, 2004). Estas poblaciones pueden ser caracterizadas como patógenas y benéficas, sobresaliendo entre los patógenos el *Clostridium perpringens, Salmonella* y *Escherichia coli,* los cuales están involucrados en la inducción de la infección y producción de toxinas, reduciendo el comportamiento productivo del pollo de engorde. En particular, el *Clostridium perfringens* es un patógeno frecuentemente encontrado en recuentos relativamente altos, sin síntomas de enteritis necrótica o supresión del crecimiento (Apajalahti y Kettunen, 2006). Dentro del género *Salmonella*, los miembros más importantes son *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. Los dos grupos invaden todos los sitios del intestino delgado, aunque se sitúan más en la parte proximal que en la distal. El primer sitio de invasión son las tonsilas cecales y luego causan una rápida inflamación de la mucosa intestinal. En cuanto a *E. Coli*, la colonización del intestino por esta bacteria, está asociada a factores de estrés, mal manejo de temperatura y ayuno, entre otros (Jay, 1996).

Collett (2005) describe tres mecanismos específicos que causan la enfermedad en el TGI: primero, organismos enterotoxigénicos como el *Clostridium perfringens* generan compuestos tóxicos como producto del catabolismo de aminoácidos, entre los que se encuentran el amonio, fenoles, índoles y aminas como histamina y cadaverina

(Fuller y Perdigón, 2003), toxinas que causan un recambio celular en el epitelio intestinal, explicando su efecto sobre el grosor de la pared intestinal (Engberg et al., 2004) y la muerte celular. Segundo, organismos enteroinvasivos como la *E. coli, Salmonella* y *Listeria* que invaden la barrera flora-huésped, estimulando en las células epiteliales una endocitosis e iniciando la liberación de citoquinas que causan muerte celular. Tercero, organismos enteropatógenos que causan lesiones, destrucción de las microvellosidades y destrucción de la barrera bacteria - huésped o del citoesqueleto. De otra parte, algunas bacterias en el TGI promueven una desconjugación de los ácidos biliares, con la consecuente reducción de la digestión de las grasas y bajas tasas de crecimiento de los pollos. La mayor severidad se ha observado en el *Streptococcus faecium* y *Clostridium perfringens* (Stutz y Lawton, 1984). En particular, el *Clostridium perfringens* es el agente etiológico de la enteritis necrótica, que se manifiesta por un bajo consumo de alimento, limitado crecimiento, diarrea y severa necrosis del TGI. El incremento en la secreción de mucina, unido a una alta tasa de recambio celular, genera alta tasa de metabolismo y síntesis de proteína, resultando en gasto que se estima entre el 23-36% de la energía corporal consumida y de pérdidas endógenas de proteína (Dibner y Richards, 2005).

La reducción de las bacterias totales por efecto de los APC conducen a disminución de la actividad del sistema inmune intestinal, lo cual libera energía para procesos metabólicos relacionados con el crecimiento (Collier et al., 2003). En consecuencia, el uso de APC permite obtener mayor disponibilidad de nutrientes, principalmente de energía y aminoácidos. Todos estos mecanismos deberían considerarse en el diseño de las alternativas propuestas para reemplazar a los APC (Niewold, 2007).

En contraste, las poblaciones de bacterias benéficas, están relacionadas con la producción de vitaminas, el estímulo del sistema inmune vía no patogénica y la inhibición de bacterias patógenas (Dibner y Richards, 2004). La microflora benéfica está representada fundamentalmente por *Lactobacillus y Bífidobacterias*, y tiene un papel en la nutrición, detoxificación de ciertos compuestos, crecimiento y protección contra bacterias patógenas, influyendo directamente en la salud y bienestar del hospedero (Amit-Romach et al., 2004). El mantenimiento de la salud intestinal depende entonces de una íntima pero armoniosa relación entre los microorganismos (Neish, 2002) y este balance afecta el comportamiento del pollo de engorde (Apajalahti y Bedford, 1999).

Dos vías se sugieren para estudiar esta afectación: la primera sugiere a la microbiota intestinal como componente importante para el desarrollo de los mecanismos de defensa de la mucosa intestinal (Oviedo-Rondón et al., 2006) y la segunda que reconoce al conocimiento de la microflora normal como fundamental punto de partida para evaluar cambios en la composición y efectividad del uso de APC en pollos de engorde (Pedroso et al., 2005, Oviedo-Rondón et al., 2006). En ambos casos, un mejor acercamiento al monitoreo molecular de la microflora intestinal, abre amplias posibilidades para manipular la microbiota, con beneficios para la salud del huésped (Satokari et al., 2003).

1.2. Técnicas microbiológicas para monitorear las comunidades del TGI

La microbiología clásica fue la herramienta fundamental para iniciar la evaluación de los efectos de aditivos alimenticios, sobre la microflora intestinal. Este enfoque permitió una evaluación parcial de algunos microorganismos, mas no un estudio profundo e integral de la ecofisiología intestinal (Apajalahti y kettunen, 2006). Dado que las técnicas convencionales involucran medios de cultivos enriquecidos o selectivos y conteos directos, el riesgo de perder información, por un crecimiento inadecuado de la mayoría de los microorganismos fue evidente (Matsuki *et al.*, 2002). Los análisis metagenómicos para monitorear la diversidad del ecosistema intestinal revelaron que hay una alta proporción de bacterias que no corresponden a las especies conocidas y aisladas, mediante los métodos convencionales de cultivo (Flint et al., 2006). Si se considera que existen alrededor de 40 géneros microbianos y centenares de especies (Mackie et al., 1999), el conocimiento que se ha alcanzado con el uso de estos métodos clásicos ha sido hasta ahora incipiente (Pedroso et al., 2005). Si a lo anterior se le añade que otros factores pueden alterar la ecofisiología intestinal, este nuevo conocimiento sobre las poblaciones microbianas es aún más significativo y crítico.

Los ribosomas están universalmente presentes en los organismos celulares y los genes que codifican las moléculas de rRNA son fuente importante de información, que en el caso de las bacterias, una pequeña subunidad del rRNA, la 16S, ha permitido estudiar la complejidad bacterial del TGI (Flint et al., 2006). Una técnica ampliamente difundida para el estudio del microbioma ha sido la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, que consiste en un proceso de síntesis *in vitro* para multiplicar secuencias de regiones

determinadas de ADN (16S en bacterias) presentes en muestras biológicas de manera simple y rápida. La técnica se basa en la repetición múltiple de un ciclo conformado por 3 etapas: a) Extracción, purificación y desnaturalización del ADN a partir de la muestra biológica, b) Hibridación de cebadores a la zona 3´ específica de cada una de las hebras de ADN y c) Extensión del cebador mediante la DNA polimerasa para la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante la PCR; finalmente, se detectan los fragmentos amplificados en la PCR o amplicones por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (Costa, 2004). Para mayor precisión y eficiencia, se ha propuesto la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, PCR-TR, la cual, es una modificación de la PCR convencional, donde se visualiza de forma inmediata cada ciclo de amplificación por medio de una señal de fluorescencia, permitiendo conocer y registrar en todo momento, la cinética de la reacción de amplificación (Pfaffl, 2001; Costa, 2004), evitando de esta forma, el uso de la electroforesis para este fin.

La PCR-TR permite la determinación de diferentes comunidades microbianas, mientras que la DGGE del fragmento 16s rDNA generado por la PCR es útil para el análisis de dichas comunidades (Hume et al., 2003; Apajalahti et al., 2001).

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante separa los productos de ADN generados por PCR para el establecimiento de huellas genéticas. La separación convencional de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa, resulta en bandas que no son diferenciales. DGGE es una alternativa para separar estos productos con base en características diferenciales del ADN desnaturalizado. Durante la DGGE, los productos de PCR encuentran concentraciones ctecientes del desnaturalizante químico, en la medida que estos migran a través del gel de poliacrilamida. Las secuencias de ADN de las diferentes bacterias desnaturalizan a diferentes concentraciones del desnaturalizante y como resultado se generan patrones de bandas, en donde cada banda representa una población bacterial diferente en la comunidad. Los patrones de bandas se cargan en una base de datos donde se determina mediante análisis de correlación, los coeficientes de similaridad y se estiman entonces diferencias estructurales entre tratamientos experimentales o ambientes (Ercolini, 2004; Muyzer et al., 1993; Hume et al., 2003). Al final se construyen dendogramas donde se representa los coeficientes de similaridad (Fig. 1). En la tabla 2 se observa un resumen de las ventajas y limitaciones de estas técnicas moleculares.

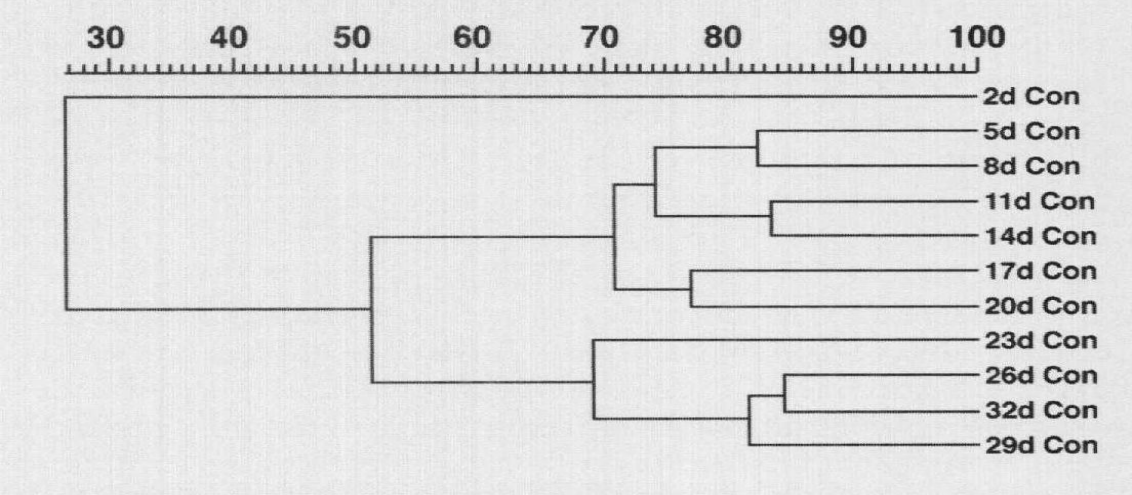


Fig. 1. Dendograma generado del perfil de bandas obtenidas por DGGE de la región 16S bacterial de ciegos en pollas livianas.

Fuente: Hume et al. (2003).

Las técnicas moleculares como DGGE son rápidas y económicas y han sido utilizadas para evaluar cambios en la microbiota en el tiempo y por efecto de la dieta, pero los resultados no permiten identificar de manera directa los microorganismos que varían, para lo cual se requiere de un procedimiento de clonación adicional y aún así, la resolución taxonómica es muy baja. La secuenciación de Sanger de toda la longitud de la 16S rRNA, ofrece el más alto grado posible de resolución taxonómica, pero limita la posibilidad de monitorear miembros menos abundantes de la comunidad (Dethlefsen et al., 2008). Recientes desarrollos en metodologías moleculares proponen la pirosecuenciación como una alternativa para superar estas limitantes y generar una gran cantidad de datos de secuencias genéticas a más bajo costo relativo (Roesch et al., 2007).

Tabla 2. Características de las técnicas moleculares basadas en la región 16S rRNA.

	Capacidad de muestra	Cuantificación	Sensibilidad	Observaciones
Análisis de secuencia de Amplicones de PCR	limitada	buena	Baja	costosa y laboriosa
PCR convencional	limitada	buena	Alta	poco usada
PCR-TR	limitada	buena	Alta	costosa
DGGE	buena	pobre	Alta	rápida

Adaptado de Flint et al., 2006

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de última generación por síntesis, la cual permite una rápida determinación de secuencias en tiempo real. Se añaden nucleótidos consecutivamente a la reacción, cuando se incorporan al molde de DNA de cadena simple, se libera pirofosfato inorgánico (PPi) acoplando la síntesis de DNA a una reacción quimioiluminicente. El DNA es extraido de la muestra y se utilizan iniciadores de regiones conservadas de la 16S rRNA para amplificar las secuencias variables. La diversidad y abundancia relativa de las secuencias variables de la 16S rRNA en la mezcla de amplicones obtenidos se analiza como una aproximación de la diversidad y abundancia relativa, de las poblaciones microbianas en la muestra. Debido a que el reconocimiento basado en la secuencia de genes de poblaciones microbianas no cultivadas no es equivalente a la clasificación taxonómica tradicional, el termino especie o cepa no es el apropiado. En consecuencia se prefiere utilizar el término unidades taxonómicas operacionales (OTUs) (Dethlefsen et al., 2008).

En resumen, el estudio de la ecología microbiana del TGI, busca entonces encontrar las relaciones entre las poblaciones bacterianas y su entorno, como los sustratos fermentativos y aditivos utilizados. El estudio de estas relaciones se facilita con técnicas moleculares permitiendo monitoreos directos e inmediatos (Belenguer et al.,

2006). Éstos estudios de diversidad intestinal son los primeros pasos hacia un conocimiento de la composición de microbiotas más complejas (Pedroso et al., 2005).

En general, estas técnicas son relativamente nuevas y aún existe poca información disponible a nivel universal, por lo que es necesario monitorear los cambios en la composición de la microflora intestinal en diferentes condiciones de producción en las fracciones del TGI, en función la dieta y aditivos como los aceites esenciales de orégano en el alimento de pollos de engorde.

1.3. Los aceites esenciales de orégano (AEO) como una alternativa al uso de antibióticos promotores del crecimiento

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos volátiles aislados de plantas medicinales. El término esencial fue adaptado de la teoría de la "quintaesencia", pero debido a la pobreza en la definición, Hay y Waterman (1993) han propuesto el término "aceite volátil". Por muchos años, las plantas y sus aceites esenciales se han usado como farmacéuticos en medicina alternativa y como terapia natural (Curtis, 1996; Mitscher et al., 1987) y por sus mecanismos de acción sistémica, los aceites esenciales son usados en aromaterapia en humanos (Lavabre, 1990). La base de datos de productos naturales Napralert muestra registros de 6.350 especies con actividad antibacteriana, pero esta actividad solamente ha sido demostrada en modelos experimentales *in vitro*, por lo que se requiere para ser relevante su papel como aditivo alimenticio, una evaluación *in vivo* más rigurosa en estudios controlados con diferentes modelos animales (Mahady, 2005). A pesar de sus reconocidas cualidades antisépticas solo recientemente se ha presentado un renovado interés por la aplicación de sus propiedades antibacterianas y funcionales para beneficio de la industria animal (Giannenas et al., 2003; Hernández et al., 2004; Williams y Losa, 2002). El mercado para este tipo de aditivos alimenticios se ha expandido rápidamente en los últimos años a nivel mundial, llegando a un consumo estimado de 600 toneladas de aceites esenciales para el año 2006, para el caso de la Unión Europea (Kamel, 2000).

Con el nombre orégano se incluyen cerca de 30 diferentes especies de plantas, de las cuales se relacionan cuatro, las comúnmente utilizadas, el griego (*Origanum vulgare ssp. hirtum*), el español (*Coridothymus capitatus*), el turco (*Origanum onites L*.) y

el mexicano (*Lippia graveolens*) (Lawrence, 1984). Oliver (1996) simplifica y generaliza la aproximación y reconoce básicamente dos tipos de orégano, el *Origanum vulgare L*. y sus especies relacionadas, nativos de la región del Mediterraneo y el género *Lippia* nativo de América tropical, subtropical y África. Esta planta se caracteriza por crecer en ambientes marginales y controlar la erosión debido a la estructura de sus raíces, por lo que puede ser usado para la preservación del suelo (Leto y Salomone, 1996). En Colombia, se ha encontrado en la cuenca media del Cañón del rio Chicamocha y en el Valle Alto del rio Patía (Albesiano et al., 2003; Albesiano y Rangel-Ch, 2006).

El análisis de la composición, permite identificar hasta 56 compuestos en los AEO con diferencias cuantitativas significativas en sólo dos fenoles isoméricos, el carvacrol (0,1-56,6%) o fenol no cristalizable y el timol (7,9-53,6%) o fenol cristalizable; incluyendo sus precursores biosintéticos, el γ-terpineno y el p-cimeno (Russo et al., 1998). En muestras de *L. graveolens Kunth*, procedentes de Jalisco, se reportó un contenido de timol superior al 30% (Uribe-Hernández, 1992). En contraste, Vernin et al. (2001) encontraron 45 compuestos que constituyeron el 92%-93% del aceite esencial de *Lippia graveolens HBK*; cuyos componentes principales fueron el carvacrol (71%) y el timol (5%). Como se puede observar, se estiman tantas composiciones en el AEO, como estudios sobre nichos de producción natural, debido posiblemente a que la regulación de la producción de aceites esenciales está integrada a la fisiología de la planta y depende del estado metabólico de la misma (Sangwan et al., 2001) y por ende su adaptación al ecosistema. En términos generales y a un nivel comercial, se sugiere que un buen AEO en el contexto multifuncional, es aquel que contiene al menos 55% de carvacrol + timol y una relación entre el carvacrol y el timol superior a 10 (Nitsas, 2000); sin embargo, a pesar de que estos dos metabolitos presentan efectos antioxidantes y antibacterianos, se ha dado mayor énfasis al carvacrol, debido posiblemente, a que la mayoría de estudios se han enfocado hacia la caracterización de variedades griegas, cuyo componente principal es el carvacrol y a la consistencia de los hallazgos experimentales, con este quimiotipo de orégano.

En general, los terpenoides son los constituyentes predominantes en los aceites esenciales de vegetales, y en menor proporción los fenilpropanoides (Sangwan et al., 2001). Los terpenoides, son sintetizados a partir de unidades de 5 carbonos de isopentenil pirofosfato (PPI) y su isómero el dimetil-alil pirofosfato (Chappell, 1995). Hasta 1993, se aceptaba que la síntesis del PPI se realiza por la vía del mevalonato en todos

los organismos vivos, pero en este año se descubrió que el PPI es sintetizado también a partir de metabolitos glicolíticos por la vía del gliceraldehido/piruvato. Los terpenoides se sintetizan a partir de unidades de IPP a través de la vía DOX-P (1-Deoxi-D-xylulosa-5-fosfato) hasta sesquiterpenos y monoterpenos (Sangwan et al., 2001), En el caso de los AEO se genera el γ-terpineno, el cual por una reacción de aromatización da origen al ρ-cimeno y este por una reacción de hidroxilación da origen al 5-isopropil-2-metilfenol (carvacrol) o el 2-isopropil-5-metilfenol (timol) (Nhu-trang et al., 2006). Estas vías metabólicas son moduladas por la fisiología de la planta y todos aquellos factores exógenos que la afectan, incluyendo la ontogenia de la planta, la fotosíntesis, el fotoperiodo, el clima, la intensidad de luz, la humedad, entre otros.

1.4. Propiedades bioactivas de los AEO

Diversos estudios atribuyen los multiples efectos de los AEO a sus dos metabolitos secundarios más abundantes: el carvacrol y el timol. Estos metabolitos han demostrado un efecto antibacterial contra una amplia gama de bacterias, no así ocurre con los precursores γ -terpineno y el *p*-cimeno (Afroditi et al., 1996); en contraste, Nitsas (2000) afirma que la presencia de γ-terpineno y el *p*-cimeno en el AEO contribuye a un efecto sinérgico sobre la actividad antimicrobial del aceite. Aparentemente, el timol es más efectivo que el carvacrol contra bacterias Gram-negativas, aunque con una actividad variable en las diferentes cepas de bacterias analizadas (Afroditi et al., 1996).

Aligiannis et al. (2001) demostraron una actividad antibacteriana importante del carvacrol de *O. Scabrum* (74.86% de carvacrol) contra dos bacterias Gram-positivas; así como también su afectividad contra hongos patogénicos como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Torulopsis glabrata*. Adicionalmente, Hammer et al. (1999) demostraron una actividad inhibitoria de AEO contra *Acinetobacter baumanii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomona aeruginosa, Salmonella entérica subsp. Entérica* serotipo *typhimurium, Serratia marcescens y Staphylococcus aureus.* Con respecto al timol, Dorman y Deans (2000) concluyeron que este compuesto, seguido del carvacrol y eugenol, son los componentes de más amplio espectro de actividad antibacteriana contra 25 diferentes géneros de bacterias que incluyen patógenos de plantas, animales y alimentos. Los autores infirieron que esta actividad se debe a la presencia de grupos hidroxilo en la estructura fenólica de la molécula.

Estas propiedades antibacterianas, unidas a otros efectos funcionales, han conducido a investigar la posibilidad de utilizar los AEO como aditivos promotores de crecimiento en alimentación animal. Los AEO se constituirían en aditivos de origen natural, sin riesgos de crear resistencias bacterianas, ni efectos residuales, ya que el carvacrol y el timol son degradados a metabolitos inactivos y así son excretados en la orina (90%) o expirados por los pulmones (10%), en forma de CO_2 (Ninkov, 2005).

Ultee et al. (1999) concluyeron que esta actividad se basa en la alteración de la integridad de la membrana, la cual tiene un gran impacto sobre el sistema de transducción de energía, disminuyendo la cantidad de ATP intracelular a valores cercanos a cero. Otros efectos que pueden estar relacionados con la acción bactericida o bacteriostática son una reducción en la síntesis de ADN y reducción de la actividad metabólica de la bacteria. A pesar de que los estudios sobre la actividad antibacteriana *in vitro* de los AEO son concluyentes, se conoce muy poco acerca de los efectos multifuncionales *in vivo*, principalmente, sobre la dinámica de la microflora intestinal en respuesta a la suplementación y nivel de los metabolitos secundarios: carvacrol y timol.

El género orégano es uno de los grupos de plantas más estudiado de la familia *Labiatae* (Jenô, 1996), por lo que es ampliamente reconocido que sus aceites esenciales, son entre otros los de mayor actividad antimicrobiana, ya que inhiben diversas bacterias patógenas, virus y hongos. Adicionalmente, se relacionan múltiples propiedades favorables para la salud humana así: antiparasitarias, diaforéticas, antiespasmódicas, tónicas, sedativas, digestivas, carminativas, emenagogo, analgésicas, expectorantes, antidisentéricas, antirreumáticas, antihemorroides, antipirético, contra la tos y bronquitis, entre otras (Lavabre, 1990). Estos resultados apoyan el uso y la comercialización de los aceites esenciales de orégano (AEO) en producción animal como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (APC), pero sus efectos sobre el comportamiento productivo y la actividad antibacteriana, requieren ser más ampliamente documentados.

En este sentido, la más importante característica de estos derivados de plantas medicinales es que son seguros, ya que el orégano es categorizado como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) por la FDA de Estados Unidos (Silva et al., 2005). Esta categoría le permite a los AEO su utilización como un ingrediente común en pastas dentales, gomas de mascar, fragancia y procesamiento de alimentos. En resumen, los efectos multifuncionales de orégano son la excelente capacidad

antioxidante y antimicrobiana, los efectos antimutagénico, anticancerígeno y antiparasitario, su capacidad para ligar progesterona y ligera actividad estrogénica es evidente, aumenta la actividad de la enzima glutatión α-transferasa, lo que sugiere un potencial anticarcinogénico, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, antidiarreico, antifúngico, anti infecciosones cutáneas, contra desórdenes hepáticos, diurético, antihipertensivo, desordenes menstruales, antimaláricas, antiesparmódico, enfermedades respiratorias, sífilis, gonorrea, diabetes y abortivo (Arcila-Lozano et al., 2004; Botsoglou et al., 2003; Zeytinoglu et al., 2003; Velluti et al., 2003; Aligiannis et al., 2001). Razón por la cual, en general, los AEO tienen usos en medicina, aromaterapia y cosmetología.

1.5. Mecanismos de acción antibacteriana de los AEO

La interacción de compuestos lipofílicos como el carvacrol y el timol con membranas biológicas de las bacterias, resulta en cambios en la estructura de la membrana, alterando su funcionamiento como barrera selectiva y como matriz para enzimas (Sikkema et al., 1995). Otro aspecto importante dentro de la patogenicidad de la bacteria es la adhesión, debido a que los microorganismos tienen que adherirse al tejido del huésped para poder multiplicarse, DalSasso et al. (2006) demostraron que la adhesividad de tres cepas de *E. coli* y de *S. aureus* a células vaginales se redujo significativamente con el suministro de timol.

Como ha sido descrito, el carvacrol tiene un efecto inhibitorio y biocida sobre un amplio rango de bacterias incluyendo *Campylobacter jejuni* y *Clostridium sporogenes* (Paster *et al.,* 1990, 1995) y *Clostridium botulinum* (Ismaiel, 1988); *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica, Clostridium jejuni y Lactobacillus sakei (*Ultee et al., 1999; Van Zyl et al., 2006; Khadija et al., 2007; Cosentino et al., 1999; Friedman et al., 2002; Gill y Holley, 2006). Oliveira et al. (2007) reportaron una actividad biocida de *L. origanoides* frente a *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus casei*.

El efecto antibacteriano del carvacrol y timol sobre las bacterias gram negativas *E. coli y S. Tiphimirium*, en una matriz real de alimentos muestra que *E. coli* sí fue inhibida por carvacrol y timol, pero siendo más sensible *S. typhimurium*. El carvacrol ejerció mayor actividad inhibitoria que el timol. Se sugiere entonces que debido a su

limitada solubilidad en agua, esos compuestos son hábiles para penetrar este tipo de bacterias (Helander et al., 1998).

Ultee et al. (1999) evaluaron la actividad bactericida de carvacrol sobre el *Bacillus cereus* y concluyeron que esta actividad se basa en la alteración de la integridad de la membrana, la cual se espera que tenga un gran impacto sobre el sistema de transducción de energía de la bacteria. Esta actividad del carvacrol depende de la concentración y tiempo de exposición. La adición de 1 mM de Carvacrol, disminuyó la cantidad de ATP intracelular a valores cercanos a cero en 14 minutos, pero no aumentó la cantidad de ATP extracelular, lo que indica que redujo la síntesis de ATP o aumentó la hidrólisis. En contraste, Helander et al. (1998) observaron una salida de ATP de bacterias gram negativas expuestas a 2 mM de carvacrol, la diferencia en este caso es que el *B. cereus* es una bacteria gram positiva. La adición de 1mM de carvacrol, disminuyó a valores cercanos a cero el ATP intracelular en 14 minutos, pero no aumentó la cantidad de ATP extracelular. El potencial de membrana, que determina la síntesis de ATP, se redujo con niveles desde 0.01mM de carvacrol, lo que va a afectar el gradiente de la membrana. La adición de 0.25 mM de carvacrol, redujo el pH interno a 1. La adición de 1mM de carvacrol redujo la cantidad de potasio intracelular, aumentó la cantidad de K^+ extracelular, pero la suma de las dos fracciones de K^+ fue constante; el potasio es el principal catión citoplasmático que tiene importantes funciones en la célula, como activador de enzimas, mantenimiento de la presión de turgencia, regulación del pH y el potencial de membrana; por consiguiente, la salida de potasio es el primer indicador de daño celular.

Para contrarrestar el efecto tóxico de este tipo de compuestos, la célula bacteriana posee diversos mecanismos de adaptación. Ultee et al. (2002), reportaron tres mecanismos diferentes que compensan la acumulación de compuestos hidrofóbicos tóxicos en la membrana: a) restaurando la fluidez de la membrana mediante la acumulación de un lípido líquido cristalino, b) guardando una adecuada proporción de lípido líquido cristalino en la membrana y c) extrusión similar al mecanismo de extrusión de drogas. Los mismos autores concluyeron que el *B. cereus* se adapta al carvacrol cuando se presenta en concentraciones no letales en el medio, mediante cambios en la fluidez y la composición de los ácidos grasos de la membrana.

El timol, ha sido parte de cremas dentales por más de cien años y es activo contra *E*. *coli*, *S. aureus*, *L*. *monocytogenes*, *C. jejuni*, *S. enterica* (Cosentino et al., 1999; Friedman et al., 2002). Trombetta (2005) evaluó el efecto del timol sobre la membrana celular mediante la liberación del marcador carboximetilfluorecina y encontraron que el *S. aureus* fue más sensible que *E. Coli* al timol; aparentemente, la membrana externa de la bacteria Gram negativa presenta una carga negativa fuerte conferida por el lipopolisacárido, lo que hace que las bacterias Gram negativas sean menos susceptibles a la acción de AEO debido a la presencia de la membrana externa, la cual restringiría la difusión de los compuestos lipofílicos. Pero no solamente la carga de la superficie influye, también la composición de fosfolípidos de la membrana; de tal forma que la presencia de fosfatidilglicerol y cardiolipina afectan significativamente la capacidad del timol para permeabilizar en la membrana, mientras que fosfatidil colina que es típica de membranas de células eucariotas, tiene un menor efecto sobre este factor.

Nostro et al. (2004) evaluaron el efecto del AEO frente a dos cepas de *S.aureus*, una sensible y otra resistente a la meticilina sin demostrar diferencias en la susceptibilidad de las dos cepas a los tratamientos evaluados, pero la mejor concentración mínima inhibitoria fue observada con carvacrol (0.015 - 0.03%, v/v) seguida de timol (0.03 - 0.06%, v/v) y AEO (0.06 - 0.125%, v/v). Otros estudios no reportan actividad antimicrobial para p-cimeno y γ-terpineno debido probablemente a la ausencia de los grupos fenólicos (Dorman y Deans, 2000; Aligiannis, 2001).

La perturbación de la membrana citoplasmática no es el único factor responsable del efecto biocida de diversos surfactantes. Se sugiere una transferencia de monoterpenos a través de la bicapa lipídica hacia el interior de la célula y una interaccion con sus componentes (Trombetta et al., 2005). Dicha transferencia de compuestos lipofílicos está relacionada con el coeficiente de partición del compuesto, en la membrana celular. En general, los hidrocarburos cíclicos son poco solubles en agua, pero los microorganismos utilizan solamente las moléculas que son solubles en fase acuosa. Una alternativa para solubilizar estos compuesto en agua, es la utilización de un cosolvente o surfactante en el diseño del producto (Sikkema, 1995).

1.6. Otros aspectos funcionales de los AEO de importancia para la Industria Animal

El timol ha demostrado propiedades anti inflamatorias relevantes porque reduce la liberación de prostanoides, interleukinas y leucotrienos (Skold et al., 1998; Yucel-Linderberg et al., 1999). Una actividad antiviral de los extractos metanólicos de *O. vulgare,* mediante la inducción de la formación de una sustancia con actividad similar al interferón (Jenõ, 1996). Süleyman et al. (1996), demostraron una actividad analgésica de 0.33 mL/kg de aceite esencial de orégano de Turkía, *O. Onites* en primates, similar a 1 mg/kg de morfina y concluyeron que esta actividad está asociada directamente con el contenido de carvacrol del aceite. Yoshino et al. (2006) concluyeron en primates que el consumo de los extractos crudos de orégano, previenen la gastritis presentando un efecto antiinflamatorio, asociado con una capacidad antioxidante. Zeytinoglu et al. (2003) encontraron que el carvacrol previene la síntesis de ADN de células de mioblasto, con una mutación N-ras (cancerígenas), lo que les permitió sugerir la posibilidad de que el carvacrol pueda ser utilizado en la terapia contra el cáncer.

Varel (2002) encontraron que la utilización de 2.5 g de carvacrol o timol por litro de excretas porcinas, inhibió completamente la producción de los compuestos que le dan mal olor: isobutirato, valerato, isovalerato y cresol, reduciendo la emisión de gases, de coliformes fecales y bacterias anaeróbias. Determinaron también que el carvacrol y el timol, bajo condiciones anaerobias fueron estables durante 62 días.

Allan y Bilkei (2005) evaluaron el efecto de la inclusión estratégica de 1000 ppm de hojas y flores secas de orégano enriquecidas con 500 g/kg de aceite esencial de *Origanum vulgare*, en dietas para cerdas en preparto y lactancia en una granja comercial. Las cerdas que recibieron la suplementación con orégano presentaron menor tasa de mortalidad, mayor tasa de nacimientos, más lechones nacidos vivos, menos peso bajo de lechones al nacimiento y un mayor consumo voluntario de alimento. Similares resultados reporta Ariza-Nieto et al. (2011) quienes además encontraron un menor intervalo destete-servicio, mayor tasa de crecimiento en los lechones de las cerdas suplementadas con AEO, mayor concentración del factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-1), más linfocitos T y células asesinas en el plasma de estos lechones. La literatura reporta diversos

efectos de los AEO y sus mezclas sobre el comportamiento de pollos de engorde como se observa en la tabla 2.

En esta investigación documental, se reporta que los AEO se distribuyen en la naturaleza a través de la configuración de diferentes quimiotipos valorados por la composición fundamentalmente de: carvacrol y timol. Se hace relevante, la gran multiplicidad de propiedades funcionales y se revisan los mecanismos para que estas actividades bioactivas sean entendidas. Los AEO han sido usados como promotores de una mejor calidad de vida en los humanos y en los animales como activadores de una respuesta más efectiva de los sistemas de alimentación y de la respuesta inmune. Igualmente los AEO presentan un acervo científico importante en términos de sus propiedades anticancerigenas, anti bacterianas, anti parasitarias, antioxidantes, entre otras, en modelos de estudio *in vitro*. Se requiere evaluar estos efectos en un contexto biológico, donde interactúan multiples factores tanto intrínsecos como extrínsecos.

En la actualidad, la industria avícola especialmente la producción de pollos de engorde confronta una coyuntura de búsqueda de alternativas de producto para los antibióticos promotores del crecimiento, siendo los AEO alternativas potenciales para ser utilizados como aditivos alimenticios zootécnicos. En este contexto, este estudio y estudios posteriores buscan enfatizar en un desarrollo experimental de los efectos de estos compuestos bioactivos en ciclos comerciales de producción, que permitan optimizar su uso y tratar de elucidar los efectos sobre el ecosistema intestinal de los pollos de engorde.

Tabla 2. Resumen de los estudios sobre los AEO y sus mezclas en aves.

Tipo A.E.	Actividad comprobada	Nivel inclusión	Fuente
Carvacrol y Timol	Antioxidante: Timol más efectivo antioxidante que el carvacrol en matriz lipídica.	0.02 y 0.05%	Yanishlieva et al. (1999). Food Chemistry 64: 59-66.
Aceite Esencial Orégano	Antioxidante: reduce valores malonaldehido en tejido de pollo de engorde.	100 mg/ kg alimento	Botsoglou et al. (2002) Br. Poult.Sci. 43: 223-230
Aceite Esencial de Orégano	Antioxidante: sinergismo del efecto antioxidante de la mezcla con α-tocoferol y del AEO en pechuga, pierna e hígado de pollo	200 mg AEO/kg y 100mg AEO+100mg α-tocoferol	Papageorgiou et al. (2003). J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr. 87: 324-335.
Aceite Esencial Orégano	Antioxidante: AEO aumenta la estabilidad oxidativa en carne de pavo. Sinergismo con α-tocoferol	200 mg AEO/kg y 100mg AEO+100mg α-tocoferol	Botsoglou et al. (2003). J. Agric. Food. Chem. 51: 2930-2936.
Aceite Esencial Orégano	Antioxidante: AEO efectivo para reducir oxidación de lípidos, pero menos que el α-tocoferol.	100 mg/kg de AEO y 100mg α-tocoferol	Botsoglou et al. (2003). Food Res. Int. 36: 207-213.
Aceite Esencial Orégano	Antioxidante: AEO redujo concentración de TBARS en pectoral mayor de pollos de engorde.	3% de *Origanum onites.*	Young et al. (2003). Poult. Sci. 82:1343-1351.
Aceite Esencial Orégano	Antioxidante: La actividad antioxidante de AEO es mayor cuando se da en la dieta con respecto a cuando se añade en la carne.	200 mg / kg de alimento y 200 mg/kg de carne.	Govaris et al. (2004). Int. J. Food Sci. Nutr. 55: 115-123.
Carvacrol y timol	Carvacrol disminuye el consumo y aumenta la conversión de alimento. Disminuye TG en plasma pero no colesterol.	200 ppm.	Lee et al. (2003). J. Appl. Poult. Res. 12:394-399.
Mezcla: Oregano, canela, tomillo y pimienta	Mejor conversión de alimento.	300 g/ton	Zhang et al. (2005). Int. J. Poult. Sci. 4: 612-619.
Mezcla: carvacrol, capsaicina y cinamaldehido	Mejor peso corporal, conversión, características sensoriales y menor recuento de *E. coli* y *Clostridium perfringens* respecto al control	300 PPM de XT.	Jamroz et al. (2003) J. Anim. Feed Sci.12: 583-596.
Mezcla Orégano, canela y pimienta	Aumento digestibilidad de alimento y mejor comportamiento en pollos	200 ppm	Hernández et al. (2004). Poult. Sci. 83:169-174.
Mezcla: Crina ® Poultry. Tiene timol y otros no definidos.	Mejor actividad amilasa intestinal.	100 ppm	Lee et al. (2003) Br. Poult. Sci. 44:450-457.
Mezcla Crina Poultry y Crina Alternate	Evitan cambios drásticos en la comunidad microbiológica debido a infección por coccidia.	100 ppm	Hume et al. (2006). Pult. Sci. 85:2106-2111
AEO (5%)	Más ganancia de peso y consumo de alimento respecto a pollos infectados con *E. Tenella*	300 mg/kg	Giannenas et al. (2003). Arch. Anim. Nutr. 57:99-106.
AEO emulsificado	Antiparasitario en humanos		Force et al. (2000)

Bibliografía:

Afroditi, S., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. J. Agric. Food Chem. 44: 1202-1205.

Albesiano, S., J. Rangel-Ch y A. Cadena. 2003. La vegetación del cañón del río chicamocha (santander, colombia). Caldasia 25:73-99.

Albesiano, S. y J. Rangel-Ch. 2006. Estructura de la vegetación del cañón del río Chicamocha, 500-1200; Santander Colombia: una herramienta para la conservación. Caldasia 28:307-325. 2006.

Aligiannis, N., E., Kalpoutzakis, S. Mitaku, And B. I. Chinou. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species. J. Agric. Food Chem. 49: 4168-4170.

Allan, P., G. Bilkei. 2005. Oregano improves reproductive performance of sows. Theriogenology. 63: 716-721.

Amit-Romach, E., D. Sklan, Z. Uni. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Poult. Sci. 83: 1093.

Apajalahti, J. and M. R. Bedford. 1999. Improve bird performance by feeding its microflora. World Poult. 15: 20-23.

Apajalahti, J. H., A. Kettunen, M. R., Bedford and W. E. Holben. 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5656-5667.

Apajalahti, J. and A. Kettunen. 2006. Microbes of the chicken gastrointestinal Tract. Ch. 8. Avian gut function in health and disease. CAB International. Washington D.C., USA. Pp. 124-137.

Arcila-Lozano, C.C., G. Loarca-Piña, S. Leconda-Uribe y E. Gonzalez de Mejía. 2004. Orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Arch Latinoam. Nutr. 54: 100- 111.

Ariza-Nieto, C., M. Bandrick, S. K. Baidoo, L. Anil, T. W. Molitor and M. R. Hathaway. 2011. Effect of dietary supplementation of oregano essential oils to sows on colostrum and milk composition, growth pattern and immune status of suckling pigs. J Anim Sci. 89:1079-1089.

Belenguer, A., S. H. Duncan, A. G. Calder, G. Holtrop, P. Louis, G. E. Lobley, H. J. Flint. 2006. Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3593-3599.

Botsoglou, N. A., P. Florou-Paneri, E. Christaki, D.J. Fletouris, and A. B. Spais. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. Br. Poult. Sci. 43:223–230.

Botsoglou, N. A., Govaris A., Botsoglou E. N., Grigoropoulou S. H, G. Papageorgiou. 2003. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. J. Agric. Food Chem. 51: 2930-2936.

Chappell J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway. Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol. 46: 521–547.

Collett, S. R. 2005. Strategies for improving gut health in commercial broiler operations. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedingsof Alltech's 21 st Annual symposium. Ed.Lyons an Jacques. Pp. 17-29.

Collier, C.T., J.D. van der Klis, B. Deplancke, D.B. Anderson and H.R. Gaskins. 2003. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, Clostridium perfringens colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 3311 – 3317.

Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, and F. Palmas. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol. 29:130–135.

Costa, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22:299-305.

Curtis, S. 1996. Essential Oils. Aurum Press. 144p

DalSasso, M., M. Culici, and P. C. Braga. 2006. Thymol: Inhibitory activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* adhesion to human vaginal cells. J. Essent. Oil Res. 18: 455-461.

Les Dethlefsen, S. H., Mitchell L. S., Relman D. A. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as Revealed by Deep16S rRNA Sequencing. PlosBiology. 6: 2383-2400

Dibner, J.J. and J.D. Richards. 2004. The Digestive System: Challenges and Opportunities. J. Appl.Poult. Res. 13: 86-92.

Dibner, J.J. and J.D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult. Sci. 84:634-643.

Dorman, H.J.D. and S.D. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308–316.

Engberg, R. M., M. S. Hedemann, S. Steenfeldt, B. B. Jensen. 2004. Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. Poult. Sci. 83: 925-938.

Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. J. Microbiol. Meth. 56:297-314.

Flint, H.J., E. C. M. Leitch, S. H. Duncan, A. W. Walker, A. J. Patterson, M. T. Rincon, K. P. Scott, and P. Louis. 2006. Molecular approaches to the analysis of gastrointestinal microbial ecosystems. C. 7. Avian Gut Function in Health and Disease. CAB International. Washington D.C., USA. Pp. 107-123.

Force, M., S. W. Sparks and R. A. Ronzio. 2000. Inhibition of Enteric Parasites by Emulsified Oil of Oregano *in vivo*. Phytother. Res. 14: 213–214.

Friedman, M., P. R. Henika, R. E. Mandrell. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J. Food Protec. 65:1545–1560.

Fuller, R., G. Perdigón. 2003. Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health. Black well Publishing, Iowa, USA. Pag 36.

Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N. A. Botsoglou, and A.B. Spais. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Arch. Anim. Nutr. 57: 99 – 106.

Gill, A.O., R. A. Holley. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus kasei* cellular membranes by plant oil aromatics. Int. J. Food Microbiol. 108: 1–9.

Govaris, A., N. Botsoglou, G. Papageorgiou, E. Botsoglou and I. Ambrosiadis. 2004. Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or a-tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. Int. J. Food Sci. and Nutr. 55: 115 -123.

Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86: 985–990.

Hay, R.K.M. and P.G. Waterman. 1993. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Longman Scientific and Technical, Essex.

Helander, I. M., H. L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, G. Leon, M. Gorris, and A. V. Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46: 3590-3595.

Hernández, F., J. Madrid, V. García, J. J. Orengo, M. D. Megías. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poult. Sci., 83:169-174.

Hume, M. E, L. F. Kubena, T. S. Edrington, C. J. Donskey, R. W. Moore, S. C. Ricke, and D. J. Nisbet. 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. Poult. Sci. 82: 1100-1107.

Hume, M. E, S. Clemente-Hernández, and E. O Oviedo-Rondón. 2006. Effects of feed additives and mixed Eimeria species infection on intestinal microbial ecology of broilers. Poult. Sci. 85: 2106-2111.

Ismaiel, A.A. 1988. The inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxin production by essential oils of spices. Diss. Abstr. Int., 48: 2834.

Jamroz, D., J. Orda, C. Kamel, A. Wiliczkiewicz, T. Wertelecki, and J. Skorupinska. 2003. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. J. Anim. Feed Sci. 12: 583-596.

Jay, J. M., 1996. Modern Food Microbiology. Chapman & Hall, International Thomson. Publishing, New York, NY.

Jenô, B. 1996. Some scientific and practical aspects of production and utilization of Oregano in Central Europe. Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. 8-12 May. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.

Kamel, C. 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. Feed Mix Special, pp: 19-21.

Khadija, R., T. Bouchikhi, A. Tantaoui-Elaraki, K. Sendide, and A. Remmal. 2007. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components of *Escherichia Coli* and *Bacillus subtilis*. J Essent Oil Res. 15: 356- 362.

Knarreborg, A., M. A. Simon, B. Enberg, B. Jansen and G.W. Tannock. 2002. Effects of dietary fat source and subterapeuthic levels of antibiotic the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. Appl. Environm. Microbiol. 68: 5918-24.

Korver, D. R. 2006. Overview of the immune dynamics of the digestive system. J. Appl. Poult. Res. 15:123

Lavabre, M. F. 1990. Aromatherapy workbook. Rochester: Healing Arts Pres.

Lawrence, B.M. 1984. The botanical and chemical aspects of oregano. Perfum Flavor. 9:41-52.

Lee, K.-W., H. Everts, H. J. Kappert, M. Frehner, R. Losa and A. C. Beynen. 2003. Effect of dietary essential oils on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br. Poult. Sci. 44:450–457.

Leto, C. And A. Salomone. 1996. Bio-agronomical behaviour in Sicilian origanum ecotypes. Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. 8-12 May. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.

Mackie, R.I., A. Sghir and H.R. Gaskins, 1999. Development microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am. J. Clin. Nutr. 69 (suppl.): 1035s-1045s.

Mahady, G.B. 2005. Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. Current Pharmaceutical Design, 11: 2405-2427.

Mathew, A.G, W. G. Upchurch, and S. E. Chattin. 1998. Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. J. Anim. Sci. 1998. 76: 429–434.

Matsuki, T, K. Watanabe, J. Fujimoto, T. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto. 2002. Development of 16S rRNA-Gene-Targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. Appl. Environm. Microbiol. 68: 5445.

Mitscher, L. A., S. Drake, S. R. Gollapudi, and S. K. Okwute. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. J. Nat. Prod. 50:1025–1040.

Muyzer, G, E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial popultions by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 59:695-700.

Neish, A.S. 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. Microbes Infect. 4: 309-317.

Niewold, T. A. 2007. The Nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hipothesis. Poult Sci. 86: 605-609.

Ninkov, D. 2005. Pharmaceutical composition suitable for use against Histomoniasis. United States Patent No. 5990, 178.

Nhu-Trang, T. T., H. Casabianca, M-F Grenier-Loustalot. 2006. Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ-terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry. J. Chromat. 1132: 219–227.

Nitsas, F.A. 2000. Pharmaceutical composition containing herbal-based active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. United States Patent 6, 106, 838, 22 August 2000.

Nostro, A., A. Blanco, M. A. Cannatelli, V. Enea, G. Flamini, I. Morelli, A. Sudano Roccaro, and V. Alonzo. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiol Lett 230: 191–195.

Oliveira, D. R., G. L. Gilda, H. R. Bizzo, D. Lopes, D. S. Alviano, C. S. Aliviano, S. G. Leitão. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. J Ethnopharm. 108:103-108.

Oliver, G.W. 1996. The world market of oregano. Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. 8-12 May. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.

Organización Mundial de la Salud. 2001. Estrategia mundial OMS de contención de resistencia a los antimicrobianos.

Oviedo-Rondón, E. O., M. E. Hume, C. Hernández, and S. Clemente-Hernández. 2006. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed Eimeria species, and supplemented with essential oil blends. Poult Sci; 85:854-860.

Papageorgiou, B. G., N. Botsoglou, A. Govaris, I. Giannenas, S. Iliadis and E. Botsoglou, 2003. Effect of dietary oregano oil and a-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 87: 324–335.

Paster, N., B. J. Juven, E. Shaaya, M. Menasherov, R. Nitzan, H. Weisslowicz, and U. Ravid. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. Appl. Microbiol. 11: 33-37.

Paster, N., M. Menasherov, U. Ravid, B. Juven. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. J. Food Protect. 58: 81-85.

Pedroso, A. A., J.F.M. Menten and M.R. Lambaist. 2005. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. J. Appl. Poult. Res. 14: 232-237.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29:e45.

Roesch, L.F., R.R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A.K.M. Hadwin, A.D. Kent. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J. 1:283-290.

Russo, M., G. C. Galletti, P. Bocchini, A. Carnacini. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. J. Agric. Food Chem. 46: 3741-3746.

Sangwan, N.S., A.H.A. Farooqi, F. Shabih and R.S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regul. 34: 3-21.

Satokari, R. M., E. E. Vaughan H. Smidt, M. Saarela J. Mättö and W.M. de Vos. 2003. Molecular approaches for the detection and identification of *Bifidobacteri*a and *Lactobacilli* in the human gastrointestinal tract. System. Appl. Microbiol. 26: 572-584.

Sikkema, J., J. A. M. de Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59:201-222.

Silva, R. Vazquez; N. T. and Dunford. 2005. Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J Essent Oil Res. 17: 668-671.

Skold K., S. Twetman, A. Hallgren, T. Yucel-Lindberg, and T. Modeer. 1998. Efect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. Eur. J. Oral Sci. 106: 571-575.

Stutz, M. W., and G. C. Lawton. 1984. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal Clostridium perfringens, and ileal weight of broiler chicks. Poult. Sci. 63:2036–2042.

Süleyman, A., Y. öztürk, R. Beis and K. Hüsnü. 1996. Investigation of *Origanum onites*, *Sidertis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. Phytoterapy Research. 10: 342-344.

Ten Doeschate, R. and H Raine. 2006. 2006. Microbes of the chicken gastrointestinal Tract. Ch. 8. Avian gut function in health and disease. CAB International. Washington D.C., USA. Pp. 3-12.

Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, and G. Bisignano. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob. Agents and Chemother. 49: 2474–2478.

Ultee, A., E.O.W. Kets and E.J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus Cereus*. Appl. Environm. Microbiol. 65: 4606 – 4610.

Ultee, A., M. H. J. Bennik and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* Appl. Environm. Microbiol. 68: 1561–1568.

Uribe-Hernández, C. J. 1992. The essential oil of *Lippia graveolens* H.B. K. from Jalisco México. J Essent Oil Res. 4: 647-649.

Van Zyl, R. L., S. T. Seatlholo, S. F. van Vuuren, A. M. Viljoen. 2006. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. J Essent Oil Res. 18: 129-133.

Varel, V. H. 2002. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. Current Microbiol. 44: 38-43.

Velluti, A., V. Sanchis, A. J. Ramos, J. Egido, S. Marín. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. Int. J. Food Microbiol. 89:145–154.

Vernin, G., C. Lageot, E. Gaydou, C. Parkanyi. 2001. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. Flavour Fragrance J. 16: 219-226.

Visek, W. J. 1978. The mode of growth promotion by antibiotics. J. Anim. Sci. 46:1447–1469.

Wierup, M. 1998. Preventative methods replace antibiotic growth promoters: ten year experience from Sweden. APUA Newsletter 16: 2- 4.

Williams, P. and R. Losa. 2002. Blending essential oils for poultry. Feed Mix. 10: 8-9.

World Health Organization. 1997. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Meeting, Berlin, Germany. Boletín electrónico latinoamericano. En http://boletinfarmacos.org.

Yanishlieva, N. V., E. M. Marinova, M. H. Gordon, and V. G. Raneva. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chemistry. 64: 59-66.

Yoshino, K., N. Higashi and K. Koga. 2006. Antioxidant and anti-inflammatory activities of oregano extract. J. Health Sci. 52: 169-173.

Young, J. F., J. Stagsted, S. K. Jensen, A. H. Karlsson, and P. Henckel. 2003. Ascorbic acid, α-tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. Poult. Sci. 82:1343-1351.

Yucel-Lindberg, T., S. Twetman, K. Skold-Larsson, T. Modeer. 1999. Efect of an antibacterial dental varnish on the levels of prostanoids, leukotriene B4, and interleukin-1 beta in gingival crevicular fluid. Acta Odontol. Scand. 57: 23-27.

Zeytinoglu, H., Z. Incesu, K. H. C. Baser. 2003. Inhibition of DNA synthesis by Carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. Phytomedicine. 10: 292-299.

Zhang, K.Y., F. Yan, C.A. Keen, P.W. Waldroup. 2005. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. Int. J. Poult. Sci. 4: 612-619.

CAPÍTULO 2

Actividad antibacterial y composición de aceites esenciales de cuatro quimiotipos de los géneros *Origanum* y *Lippia*

Liliana Betancourt, MSc[13], Vienvilay Phandanauvong, MSc[2], Rocío Patiño MSc[2], Claudia Ariza, PhD[2,] Germán Afanador, PhD[1]

[1] Universidad Nacional de Colombia, [3] Universidad de La Salle. [2] CORPOICA, Bogotá, Colombia.

Artículo preparado para la Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.

Abstract publicado en: Poult. Sci. Vol. 89, E-Suppl. 1; J. Anim. Sci. Vol. 88, E-Suppl. 2;

J. Dairy Sci. Vol. 93, E- Suppl. 1

Antibacterial activity and composition of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus

Actividad antibacterial y composición de aceites esenciales de cuatro quimiotipos de los géneros *Origanum* y *Lippia*

Atividade antibacteriana e composição de óleos essenciais de quatro quimiotipos dos gêneros *Origanum* y *Lippia*

Summary

Several studies have showed the antibacterial activity of oregano essential oils (OEO) chemotypes, carvarol and thymol against Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria, but lack information on AEO antibacterial activity against beneficial bacteria. The objective of this study was to compare the composition and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Origanum* gender chemotypes: *O. vulgare* ssp *hirtum* (OH), *O. majorana* (OM) y *O. vulgare L* (OL) cultivated in Colombia, against *Lippia origanoides* (LO) from Alto Patía in Colombia, and *O. vulgare* ssp *hirtum* (OG) from Greece. The OEO composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer and its antibacterial activity by broth dilution and agar culture method. Three chemotypes were evaluated, OH and OG were carvacrol-type, LO and OL were thymol-tipe and OM was rich in sabinyl compound. The highest precursors content was showed to OEO from oregano varieties produced under greenhouse conditions at high altitude. The same bactericidal activity against *S. enteritidis* (0.098 mg/mL) for OH and LO was founded. The lowest bactericidal activity against beneficial bacteria *L. acidophilus* and *B. breve* was observed for OM (6.25 mg/mL) and LO (50 mg/mL), respectively. These results showed that LO native to Colombia had a comparable effect to OH and carvacrol against pathogenic enterobacteria, and the lowest bactericidal activity against beneficial bacteria. These results also suggested that LO and OM chemotypes could have a different action mechanism respect to OEO from high carvacrol chemotypes on broiler chicken gut.

Key word: Bactericidal, *Escherichia, Lactobacillus, Salmonella,* oregano.

Resumen

Diversos estudios demuestran la actividad antibacterial de distintos quimiotipos de aceites esenciales de orégano (AEO), carvacrol y timol, contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, pero muy poca información está disponible sobre el efecto de los AEO en bacterias benéficas. El objetivo de este estudio fue comparar la composición y concentración mínima bactericida (CMB) de AEO de quimiotipos del género *Origanum*: *O. vulgare* ssp *hirtum* (OH), *O. majorana* (OM) y *O. vulgare L* (OL) cultivados en Colombia, frente *Lippia origanoides* kunth (LO) nativo del Alto Patía en Colombia y *O. vulgare* ssp *hirtum* cultivado en Grecia (OG). Los AEO se obtuvieron por arrastre de vapor, la composición se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la actividad antibacteriana mediante el método de dilución en caldo y cultivo en agar. Se evaluaron tres quimiotipos de AEO: OH y OG tipo-carvacrol, LO y OL tipo-timol y OM rico en compuestos sabinilo. Los quimiotipos de orégano producidas bajo condiciones de invernadero a alta altitud mostraron un alto contenido de precursores. Un valor similar de concentración mínima bactericida contra *S. enteritidis* (0.098 mg/mL) fue observada para carvacrol, OH y LO. La más baja actividad bactericida contra las bacterias benéficas *L. acidophilus* y *B. breve* fue observada para OM (6.25 mg/mL) y LO (50 mg/mL), respectivamente. Estos resultados mostraron que LO, nativo de Colombia presentó un efecto comparable a OH y carvacrol contra enterobacterias patógenas y una baja actividad bactericida contra las bacterias benéficas. Los resultados también sugiere que los quimiotipos LO y OM podrían tener un mecanismo de acción diferente a los quimiotipos ricos en carvacrol en el sistema gastrointestinal de pollos de engorde.

Palabras clave: Bactericida*, Escherichia, Lactobacillus, Salmonella,* régano.

Resumo

Vários estudos têm demonstrado a atividade antibacteriana de quimiotipos diferentes de óleos essenciais de orégano (OEO), carvacrol e timol contra bactérias patogênicas, Gram positivas e Gram negativas, mas muito pouca informação está disponível sobre o efeito sobre as bactérias benéficas. O objetivo deste estudo foi comparar a atividade bactericida e composição de quatro quimiotipos de OEO, *Origanum majorana* (OM) e *Origanum vulgare* L. (OL) cultivadas na Sabana de Bogotá, *Lippia origanoides* (LO) nativo do Alto Patia da Colombia e *Origanum vulgare* H. (OH) da Grécia. A composição dos óleos foi analisada por GC / MS e a atividade antibacteriana pelo método de diluição em caldo e cultivo em ágar. O OH da Grécia teve o maior nivel de carvacrol (90,3%), mas o maior nivel de timol foi encontrado em LO da Colômbia (78,7). OM é rico em compostos sabinilo (24%). OL apresentou mais conteúdo do timol (21%). As variedades de orégano originarias da Sabana de Bogotá em altitudes elevadas apresentaram os maiores níveis de precursores, 17% e 41% para a OM e OL, respectivamente. Carvacrol, OH e LO mostraram o mesmo valor de concentração mínima bactericida contra *S. enteritidis* (0,098 mg / mL). As mais baixas concentração con efeito bactericida contra as bactérias benéficas foram de 6,25 mg / mL para OM contra *L. acidophilus* e LO (50 mg / mL) contra B. breve. Estes resultados também sugerem que quimiotipos LO e OM poderia ter uma mecanismo de ação diferente em comparação com quimiotipos rico em carvacrol no trato gastrointestinal de frangos de corte.

Palavras chave: Bactericida, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, orégano.

Introduction

Origanum genus covers a wide range of more than 60 plant species used as spices. The majority of them belong to *Lamiaceae* and *Verbenaceae* families, among these species, *Origanum vulgare* L. and *Lippia graveolens*, are considered species of economic importance, but with a large distinction between them (Paludosi et al., 2002).

Antimicrobial activity of OEO as well as two of their main constituents, thymol and carvacrol, has been documented. This property has been attributed to the presence of hydroxyl groups in their phenolic components (Ben et al., 2006), and the presence of a free hydroxyl group has been shown to be essential for antimicrobial activity. Selectivity

against Gram-negatives and Gram-positives bacteria has been observed for OEO (Dorman and Deans, 2000). Lambert *et al.* (2001) showed antibacterial activity of OEO, carvacrol and thymol against *Pseudomonas aeruginosa.* Also they found higher permeability of cells to nuclear stain EB, dissipated pH gradients and be able to bring about leakage of inorganic ions. Based on broad spectra of antibacterial activity, oregano seems to be one of the inhibitoriest species ever tested (Aligiannis, 2001), however, there are few references to the antimicrobial activity of OEO against pathogenic and benefic strains of bacteria for animals and humans health.

It is well known that the regulation of production and synthesis of essential oil metabolites is integrated into the plant physiology and depends on the metabolic state and its adaptation to the ecosystem. Latitude and elevation determine the climate, which in turn, affects soil types and vegetation. In particular, Colombia presents altitudinal gradients along with its mountains which are associated with alteration in a number of environmental factors, such as air temperature, pluviosity, wind exposure, light intensity, radiation, soil fertility, ozone density and partial CO_2 pressure. The combination of all these factors exerts stress on plants, which triggers, not only morphological and anatomical adaptations, but also biochemical changes and productivity patterns (Kofidis et al., 2003).

Colombian oregano has two different geographic origin: the first one cultivated oregano which is an European oregano used as a flavoring in foods, and the wild oregano that is a resemblance to Mediterranean oregano in terms of flavor, aroma, but its genus is *Lippia* with an outstanding feature characterized by its differences in the OEO composition reported for the same species from different local ecosystems. Cultivated oregano belongs to *O. vulgare* L., native to Greece and *O. majorana*, cultivated in Europe (Skoula and Harbone, 2002) while wild oregano classified as *L. origanoides* is a native species found in countries like Colombia (Stashenko et al., 2010). *L. origanoides* grows at low altitudes with high temperature (Albesiano y Rangel, 2006). In contrast; *O. vulgare*, is cultivated at high altitude and low temperature (13ºC) in Sabana de Bogotá.

The OEO are composed of more than 50 phytochemically different molecules, terpens, phenols, alcohols, organic acids, aldehydes and ketones. Many *Origanum* plants are characterized by a wide range of volatile secondary metabolites and in chemical

composition in relation to EO differences with respect to essential oil content, composition and antibacterial activity. Most studies have agreed that it is necessary to separate and identify the active components with an antimicrobial effect in the essential oil. Chemo typing (biochemical composition) and accurate classification of the plant will allow us to evaluate the pharmacological action of the oil (Skoula and Harbone, 2002) in order to find convenient practical applications.

Most studies have assessed the antimicrobial activity and the essential oil composition of *Origanum* genus against pathogenic microorganisms, while few studies have been conducted to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* and *Lippia genus* crop in Colombia against benefic and pathogenic microorganisms. On the other hand, *Salmonella* spp. is of major concern to public health and represents one of the most important causes of gastroenteritis in humans (Uribe and Suearez, 2006). The mechanisms have been evaluated to explain the antibacterial activity of essential oils. Thymol and carvacrol were able to disintegrate the outer membrane of Gram-negative bacteria, release lipopolysaccharides (LPS), increase the permeability of the cytoplasmic membrane to adenosine triphosphate (ATP) and allow ions to leave the cytoplasm. The mechanism of inhibition appeared to be a combination of interference with acylated homeserine lactone (AHL) activity and modulation of the synthesis of AHL's. Vattem *et al.* (2007) results also indicated that various phytochemical extracts which inhibited quorum sensing (QS) also inhibited swarming of pathogenic bacteria, known to be modulated by QS. The observation that phytochemicals from foods can inhibit QS related processes opens up an exciting new strategy for antimicrobial chemotherapy and lead to the discovery of new category of antibiotics which can overcome the issues related to antimicrobial resistance. The development of new antimicrobials that act on novel bacterial targets and that are less susceptible to resistance is of primary importance for the animal industry.

The objetive of this study were to relate the chemical composition of the hydro-distilled essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometer with the antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum majorana*, *Origanum vulgare L*, *Lippia origanoides* and *Origanum vulgare L ssp. hirtum* by broth microdilution method against the following benefic pathogenic microorganisms: *Lactobacillus acidophilus,*

Bifidobacterium breve and pathogen microorganisms *Salmonella enteritidis*, *Salmonella thyphimurium* and *Escherichia coli.*

Materials and Methods

Plant material.

Aerial parts of *O. vulgare L* (OL) and *O. majorana* (OM) were collected from greenhouses of the ecosystem Sabana of Bogotá and *L. origanoides* (LO) obtained from wild-growing populations located in the ecosystem Alto Patía in Colombia. The plants were submitted and identified in the Herbarium of Universidad Nacional de Colombia, Faculty of Science.

Essential oils extraction and analysis.

The essential oils were extracted using hydro distillation, with a Clevenger-type similar apparatus for 3 h and the oil was collected and stored at 4ºC. An Agilent Technologies 6890 Plus gas chromatograph coupled with an ion trap detector mass spectrometer, equipped with a FID detector was used. A DB-5 capillary column, 60 m x 0.25 mm, film thickness 0.25um, (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Injector and detector temperatures, 240^{o}C; split ratio, 50:1 mL/min. The essential oils constituents were identified by comparison with their relative retention times and mass spectra, using data base NIST and Wiley Registry of Mass Spectral Data. A standard solution of *n*-alkanes was used to obtain the retention indices (Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander).

Bacterial strain and growth conditions.

Bacteria were American Type Culture Collection (ATCC), obtained from the National Laboratory of Veterinary Diagnostic of Colombia Agricultural Institute (Bogotá, Colombia). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356*, Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028 and *Escherichia coli* ATCC 25922 by broth dilution method. *S. enteritidis* and *S. thyphimurium* strains were incubated on Mueller-Hinton broth plates (Oxoid CM337) in an aerobic atmosphere at 37 ºC for 24 h. *B. breve* was incubated on MRS broth (MRSB, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) in an anaerobical condition at 37 ºC for 96 h but

Lactobacillus acidophilus was incubated on MRS broth in an anaerobic condition at 37 ºC for 24-48 h. After this period of time the culture was diluted in Peptone Buffer Solution (Oxoid CM225) and a concentration of 10^6 CFU/mL was obtained, such that the final concentration of the microorganism in each cell of the assay was approximately 5 x 10^5 CFU/mL. Cell and inoculum were carried out for the recount on the plates in order to confirm the CFU concentration.

Antimicrobial assay by broth microdilution.

The MBC is the lowest concentration of one product that is capable of inhibiting visible growth of a microorganism on the agar plate. The broth microdilution assay was performed as described previously (Hammer et al., 1999). In all assays a positive growth control was included (well with bacterial inoculum, but without any oil) and a negative growth control (well with 100 µL of oil at 50 mg/mL without the inoculum) (Peñalver et al., 2005). Initial emulsions of oils were prepared at 100 mg/mL in sterile distilled water with 10% Tween 80. Serial dilutions of the stock solutions in broth medium (50µL of Mueller-Hinton broth and 50µL of stock solution) were prepared in a microtiter plate (96 wells), final volume of 100 µL by well (50 µL of serial dilutions and 50 µL of inoculum) ranging from 50 mg/mL – 0.0976 mg/mL. The final concentration of the microorganism in each well after inoculation was approximately 5 x 10^5 CFU/mL (Zhou et al., 2007). Each assay was done in triplicate.

After incubation, each well was inoculated on Mac Conkey agar (*E. coli*), Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (*Salmonella*) and MRS agar (*Lactobacillus and Bifidobacteria*) Mueller- Hinton agar plate and then incubated again. After this time, well was read and total absence of bacterial colonies in the agar plate was considered a positive result. All oils were exposed to each microorganism.

Results

Composition of oregano essential oils.

Fifty four compounds were identified in the volatile fraction of *Origanum* and *Lippia* genus essential oils (Table 1). Major biochemically related groups of compounds were observed in *O. Vulgare* ssp. Aromatic mono-terpenes, were mainly represented in

oregano by carvacrol, thymol, and their precursors, *p*-cymene and γ-terpinene. Carvacrol showed the highest value in *O.vulgare* ssp. *hirtum* (90.3%) while thymol (78.7%) was highest in *L. origanoides. L. Origanoides* is an endemic species Patia region in south of Colombia. *O. majorana* was mainly represented by sabinene (4.3%) and cis- and trans-sabi- nene hydrates (17.1%), but also included γ -terpinene (14.0%), very low *p*-cymene (3.1%), thymol (10.0%) and carvacrol (3.7%). In contrast, the major volatile compounds found in *O. vulgare* L. was thymol (21.51%) and carvacrol showed the lowest value (4.3%).

Antibacterial activity.

The MBC against *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli, L. acidophilus* and *B. breve* showed by *O. vulgare L* (OL), *O. vulgare L* ssp. *hirtum* (OH), *O. majorana* (OM), L. *origanoides* (LO) and carvacrol, are presented in Table 2. Different bacteria demonstrated a wide range of sensitivity to different compounds.

Table 1. Oregano essential oil composition of species grown in Sabana de Bogotá

Metabolite	Relative composition, % *Lippia origanoides*	*Origanum majorana*	*Origanum vulgare L*	*Origanum vulgare H*
Methyl 2-methylbutyrate	---	---	0.1	---
α-pinene	<0.1	0.8	1.4	<0.1
α-phellandrene	<0.1	1.0	3.1	---
Camphene	---	<0.1	0.6	<0.1
β –pinene	---	0.6	0.4	---
Sabinene	---	4.3	0.4	---
δ-3-carene	0.1	<0.1	0.2	---
3-heptanone	---	---	0.1	---
β –myrcene	0.9	2.4	4.1	0.1
α-terpinene	0.5	5.2	5.9	0.1
Limonene	0.3	3.6	1.5	0.1
β-phellandrene	0.1	1.2	0.5	0.1
Eucaliptol	0.2	0.1	0.1	<0.1
Cis-β-cymene	---	2.6	---	---

γ-terpinene	2.7	14.0	20.3	1.0
3-octanol	---	---	1.8	---
ρ-cymene	6.6	3.1	21.0	2.7
Terpinolene	0.1	1.5	0.4	---
3-octenyl acetate	---	<0.1	---	---
allo-ocymene	---	0.2	---	---
1-octen-3-yl acetate	---	0.7	---	---
3-octanol	---	<0.1	0.2	---
1-octen-3-ol	---	0.2	1.9	---
Cis-sabinene hydrate	0.3	2.6	0.3	---
Linalool	0.6	1.0	0.1	0.3
1-nonen-3-ol	---	---	0.1	---
Trans-sabinene hydrate	0.1	14.5	0.4	---
Thymol methyl ether	---	2.3	0.1	---
carvacrol methyl ether	---	6.0	0.1	0.3
Terpinen-4-ol	0.9	6.0	1.2	0.2
Trans-β-caryophyllene	2.1	1.0	3.7	0.7
Cis-dihidrocarvona	---	---	0.1	---
Trans-p-ment-2-en-1-ol	---	0.4	---	---
Trans-dihydrocarvone	---	---	<0.1	---
α-*h*umulene	1.2	---	0.2	---
cis-piperitol	---	0.3	---	---
γ –muurolene	0.1	---	---	---
α-terpineol	---	1.8	0.2	---
Borneol	---	0.2	1.4	0.1
Germacrene	---	2.8	0.2	---
Carvone	---	---	0.1	---
B-bisabolene	0.3	0.8	1.5	0.4
Bicyclogemacrene	---	3.0	0.3	---
Δ-cadinene	---	<0.1	<0.1	---
B-phellandrene	---	---	<0.1	---
p-cymen-8-ol	---	---	<0.1	---

Thymil acetate	---	---	0.1	---
Carvacryl acetato	---	---	---	---
Caryophyllene oxide	0.4	---	0.2	0.2
Germacrene D-4-ol	---	0.1	---	---
Spathulenol	---	---	0.1	---
Thyimol	78.7	10.0	21.5	3.5
Carvacrol	0.9	3.7	4.3	90.3
Timohydroquinone	---	0.4	---	---

Carvacrol was most effective in inhibiting the growth of *E. coli* (0.006 mg/mL) followed by *L. origanoides* (0.78 mg/mL). *Carvacrol, O. vulgare H* and *L. origanoides* were most potent against *S. enteritidis* and carvacrol was highly effective against *S. typhimurium* (0.098 mg/mL). *E. coli* was inhibited LO and carvacrol, and it was less susceptible than *S. enteritidis* and *S. thyphimurium.* The greatest difference was for *B. breve*, while the MIC obtained for carvacrol was 1.56 mg/mL compared to MBC for *L. origanoides* of 50 mg/mL and OM of 6.25 mg/mL. The *O. majorana* essential oil showed the lowest inhibitory activity against pathogenic bacteria. These results clearly showed that OEO rich in thymol from Patía ecosystem could have a desirable antibacterial effect.

Table 2. Antimicrobial activity of oregano essential oils against selected pathogens and beneficial

	MCB* (mg/mL)				
	Pathogenic Bacteria			Beneficial Bacteria	
Essential oils	*Salmonella enteritidis* ATCC 13078	*Salmonella thyphimurium* ATCC 14028	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Lactobacillus acidophillus* ATCC 4356	*Bifidobacterium breve* ATCC 15700
Carvacrol	0.098	0.098	0.006	3.125	1.560
O. vulgare H	0.098	0.390	3.125	6.250	6.250
O. majorana	1.560	3.125	6.250	12.500	3.125
O. vulgare L	0.780	0.780	3.125	1.560	3.125
L. origanoides	0.098	1.560	0.780	3.125	50.000

*MBC: minimum bactericidal concentration

Discussion

This study confirms that *hirtum* subspecies is higher in carvacrol rather than thymol. The subspecies *O. vulgare* ssp. *hirtum* is widely used as a spice under the name 'Greek oregano', it is considered to have the highest quality in the market. The essential oil composition of this subspecies, however, was not homogenous. *Origanum* genus can be divided into three chemotypes: carvacrol-type (*O. vulgare* ssp. *hirtum*), thymol-type (*O. vulgare* L.) and Sabinene-type (*O. majorana*) (Skoula et al., 1999). Franz (1990) observed that the most important factors for crude drug quality of oregano are: high carvacrol content in the essential oil, the quantity of the oil, and its sensorial characteristics. From this point of view, the *Origanum* genus has a large variability and thus provides an excellent basis for selection activities.

L. origanoides has been shown to tolerate dry soils and long droughts (Camargo and Rodriguez, 2008) which is a typical condition of Patía region. Previous studies conducted in Brazil by Do Santos *et al.* (2004) showed that analyses of the oils from *L. origanoides* leafs demonstrated that carvacrol was the major component together with γ -terpinene, thymol, and *p*-cymene. In contrast, in this study, carvacrol was present only as a trace constituent (0.9%). New chemotypes has been proposed for this specie (Lee et al., 2003). It is also known that crop, weather and seasonal conditions can affect secondary metabolite production (Skoula and Harbone, 2002).

The *O. majorana* composition was similar to the thujanes group which are mainly represented by sabinene and by cis- and trans-sabi-nene hydrates, but also include their derivatives cis- and trans-sabinene hydrate acetates, trans-sabinol and sabina ketone, together with *α*-thujene. These are together referred to as 'sabinyl' compounds. The sabinyl and the cymyl compounds are mutually exclusive. Most *Origanum* species are rich either in sabinyl compounds or cymyl compounds. It was suggested that one or more components of the cymyl pathway act throughout the *Origanum* gender, to suppress the sabinyl pathway (Skoula et al., 1999).

Our results were similar of those reported by Skoula and Harborne (1999) who have shown that the essential oil of *O. vulgare* L. is characterized principally by thymol and carvacrol (24.7 and 14.0% of the total oil, respectively) and by their two monoterpene precursors, γ-terpinene and *p*-cymene, 11.7 and 14.6% of the total oil, respectively. In this

study, the highest content of precursors was observed in oregano species that grows in green house; it is known that composition depends on the climatic and environmental conditions under which they were grown (Sangwan et al., 2001).

Despite of great variability in the content of carvacrol and thymol, the European oreganos have been considered the best ones, and in general they have a higher content of carvacrol (Do Santos et al., 2004). However, in tropical America and Africa ecosystems, chemotypes with a high thymol contents might be important. Additionally, carvacrol has shown to have more negative effects than thymol (Lee et al., 2003), raising the question about if a high carvacrol content in the essential oil, is a good indicative of its quality.

Previous data and our results confirm that most *Origanum* species are rich either in sabinyl or cymyl compounds, but never together. Skoula and Harborne (2002) found that the hybrid between sabinyl-rich *O. microphyllum* and cymyl- rich *O. vulgare* ssp. *hirtum* contains mainly cimyl compounds, while the sabinyl constituents have been suppressed.

A higher bacterial inhibitory capacity was observed by chemotypes that have the oils with a higher percentage of phenolic components (carvacrol and thymol) in comparison with oils containing high sabinyl compounds. Additionally, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were less sensitive than the pathogens to both carvacrol and oils. Gram-negative bacterias were more sensitive than gram-negative possibly because gram-negative bacteria have a cell wall less complex than gram-positive bacteria whose wall is formed by a multilayer. However, Aligiannis et al. (2001) showed that OEO exhibited a very interesting antimicrobial profile against six Gram negative and positive bacteria. Peñalver *et al.* (2005) obtained similar results against *Salmonella* and Si *et al*. (2005) against *Salmonella, E. coli* and *Lactobacillus*. Previous studies have shown that compounds such as γ-terpinene and *p*-cymene did not have any activity against the bacterial strains tested, whereas carvacrol exhibited high levels of antimicrobial activity (Dorman and Deans, 2000). Ultee et al. (2002) showed that the hydroxyl group of this compound is importante for the antibacterial activity of carvacrol and thymol.

Carvacrol and thymol showed a similar antibacterial activity against *S. enteritidis*, similar to results founded by Ultee et al. (2002) agains *B. cereus, S. aureus and P. aeruginosa*. Michiels *et al*. (2009) showed synergism of carvacrol and thymol, carvacrol inhibited the growth of *S. tiphymurium* at 0.4 mg/mL, but carvacrol + thymol inhibited at 0.1 mg/mL. Synergism between carvacrol and its biological precursor *p*-cymene had been noted when acting on *Bacillus cereus* (Oliveira et al., 2007), but no antimicrobial activity has been reported for *p*-cymene or γ-terpinene (Dorman and Deans, 2000).

Similar to our study, Si *et al.* (2005) concluded that most of the oil/compounds demonstrated high efficacy against *S. typhimurium* DT104, *E. coli* O157: H7 and *E. coli* K88 with little inhibition towards *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*, demonstrating potential in terms of efficacy and selectivity against bacterial pathogens and reduction of human and animal bacterial pathogens. Essential oils rich in phenolic compounds, such as carvacrol, are widely reported to possess high levels of antimicrobial activity (Ben et al., 2006). *Origanum* ssp. were previously tested against several pathogenic bacteria, some studies showed that *Origanum scabrum*, which contains 75% of carvacrol, had a very high antibacterial effect against *S. aureus* and *E. coli* (Dorman and Deans, 2000). In general, essential oils, as antimicrobial agents are considered to be low risk for resistance development by pathogenic microorganisms (Aslim and Nihal, 2008). These results suggest that OEO can be alternatives to the use of antibiotics as antimicrobials.

Conclusions

The results of this study confirmed the antimicrobial activity of some OEO chemotypes, as well as their potential application against *Salmonella* and *E. coli.* The specie *Lippia origanoides* native of Patía, Colombia, can be considered thymol type and presented an antibacterial activity similar to Greek oregano species, which were rich in carvacrol. *O. majorana* presented the lowest bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria, but *L. origanoides* presented the lowest bactericidal activity against beneficial and high bactericidal activity against pathogenic bacteria.

Acknowledgment: Laboratorio de Toxicología, Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (análisis de AEO), Laboratorio de Microbiología de

Corpoica, Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de La Salle y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

References

Albesiano S y Rangel-Ch J. Estructura de la vegetación del cañón del río Chicamocha, 500-1200 m; Santander Colombia: una herramienta para la conservación. Caldasia. 2006; *28*: 307-325.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou I B. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two Origanum species. J Agric and Food Chem 2001; *49*: 4168-4170.

Aslim Belma and Nihal Yucel. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. Food Chemistry 2008; *107*: 602-606.

Ben A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N and Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol 2006; *43*: 149-154.

Camargo-Parra AA y Rodríguez LNF. Respuestas fenotípicas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* (*Verbenaceae*) a la disponibilidad de agua en el suelo. Acta biol Colomb 2008; *13*: 133-148.

Dorman HJD and Deans SD. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; *88*: 308-316.

Do Santos FJ, Lopes JA, Cito GL. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. J Essent Oil Res 2004; 16: 504-506.

Franz C. Sensorial versus analytical quality of marjoram. Herb Hung 1990; *29*: 79-86.

Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86: 985–990.

Kofidis G, AM Bosabalidis, and M Moustakas. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). Ann Bot 2003; *92*: 635-645.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P and Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 2001*; 91*: 453-462.

Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Yeom KH, and Beynen AC. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. J Appl Poult Res 2003; *12*:394-399.

Michiels J, Missotten JAM, Fremaut D, Smet S, Dierick NA. *In vitro* characterization of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. Anim Feed Sci Tech 2009; *151*: 111-127.

Oliveira DR, Gilda G L, Bizzo H R, Lopes D, Alviano D S, Aliviano C S, Leitão S G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. J Ethnopharm 2007;108:103-108.

Padulosi S, Leanman D, and Quek P. Challenges and opportunities in enhancing the conservation and use of medicinal and aromatic plants. J Herb Spices Med Plant 2002*; 9*: 243-267.

Peñalver P, Belén H, Borge C, Astorga R, Romero R and Perea A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. APMIS 2005*; 113*: 1-6.

Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, and Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Reg 2001; *34*: 3-21.

Si W, Gong J, saoRT, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, and Du Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. J Appl Microbiol 2005; 100:296-305.

Skoula M, Panagiota G, George N, Christopher B, and Johnson A. Chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). Phytochemistry 1999; 52:649-657.

Skoula M and Harborne J. The taxonomy and chemistry of Origanum. Genus. *In*: Spiridon E (ed.). *Oregano, the genera Origanum and Lipia.* London and New York: Taylor & Francis; 2002: 127-150.

Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA, Arias G, Durán C, Salgar W, Cala M, and JR Martínez. Lippia origanoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. J Sep Sci 2010; *33*: 93-103.

Ultee A, Bennink MHJ, and Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 2002*; 68*:1561-1568.

Uribe C, and Suárez MC. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colomb Med 2006*; 37*: 151-156.

Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, and McLean RJC. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia 2007; *78*: 302-310.

Zhou, H., H. Zhou, J. Gong, J. T. Brisbin, H. Yu, B. Sanei, P. Sabour, and S. Sharif. 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. Poult Sci; 86: 2541-2549.

CAPITULO 3

Efecto de la suplementación con aceites esenciales de orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde

Liliana L Betancourt[1,2]*, MSc.; Claudia J Ariza-Nieto[2], PhD; Germán Afanador-Téllez[1], PhD.

[1]Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, [2]Universidad de La Salle, Bogotá, [3]CORPOICA, Bogotá.

Artículo enviado a: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

Abstract publicado en: Poult. Sci. Vol. 89, E-Suppl. 1 pag. 605; J. Anim. Sci. Vol. 88, E-Suppl. 2; J. Dairy Sci. Vol. 93, E- Suppl. 1.

Efecto de la suplementación con aceites esenciales de orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde

The effect of supplementation with oregano essential oil on ileal digestibility, intestinal histomorphology and performance of broiler chickens

Efeito da suplementação com óleos essenciais de orégano sobre a digestibilidade ileal, morfometria intestinal e desempenho produtivo de frangos de corte

Resumen

Los aceites esenciales de orégano (AEO) se han propuesto como alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes quimiotipos de aceites esenciales de orégano (AEO) sobre la digestibilidad ileal (DI) de proteína cruda, grasa y energía en dietas para pollos de engorde. El estudio comprendió 6 tratamientos: 200 ppm de AEO procedente de 3 variedades producidas y cultivadas en la Sabana de Bogotá, Colombia: *O. vulgare H.* (OH); *O. vulgare L.* (OL) y *O. majorana* (OM); 50 ppm de aceite esencial de *O. vulgare H*. cultivado en Grecia (OG); 500 ppm del antibiótico promotor, clortetraciclina (AB) y el control sin ningún tipo de aditivo (C). Entre los 14 y 21 días de edad, los pollos recibieron una dieta de iniciación con 0.5 g/kg de óxido de cromo (Cr_2O_3) como indicador inerte. Se colectó la digesta ileal y se analizaron los contenidos de: materia seca, proteína, grasa, energía y cromo en alimento y en el contenido ileal. El tratamiento AB presentó la mejor DI de la proteína comparado con C (83.7 vs 75.3%, respectivamente) (*P<0.05*). La más alta DI de energía y grasa fue para OM y AB respecto a C (P<*0.05*), lo cual se reflejó en un mayor peso corporal en estos grupos experimentales a los 21 días de edad. Entre estos grupos no se observaron diferencias significativas, pero sí con los demás grupos experimentales (P<0.05). Se estimó una correlación negativa entre el consumo de carvacrol y el peso corporal (r = -0.55) y una correlación positiva con el consumo

de timol (r = 0.46) (*P<0.05*) a los 21 días de edad, lo cual demuestra la relevancia de evaluar diferentes quimiotipos de AEO en el proceso a generar una alternativa para los antibióticos promotores del crecimiento. Los resultados de este estudio también confirman otros efectos funcionales de los AEO no asociados al contenido de carvacrol y la actividad antibacteriana.

Palabras clave: *Carvacrol, digestibilidad, pollos de engorde, timol*

Summary

The oregano essential oils (OEO) have been proposed as an alternative to antibiotics growth promoters for broiler chicken. The objective of this study was to evaluate the effects of different OEO chemotypes on protein, fat and energy ileal digestibility (ID) in broiler chickens diet. Six treatments were evaluated: 200 ppm of OEO from 3 OEO chemotypes produced and ground in Colombia: *O. vulgare L* ssp. *hirtum* (OH), *O. vulgare L*. (OL) and *O. majorana* (OM); 50 ppm of OEO from *O. vulgare L* ssp. *hirtum* ground in Greece (OG); 500 ppm of Chlortetracycline (AB), and control group without additives (C). Broiler chickens were fed with starter diets supplemented with 0.5 g/kg of chromium oxide (Cr_2O_3) as an inert marker between 14 and 21 day of age. The ileal digest was collected and dry matter, protein, fat, energy and chromium were analyzed in both feed and ileal content. The AB treatment showed the higher protein ID compared to C (83.7% vs. 75.3%, respectively) (*P<0.05*). The highest energy and fat ID was presented by OM and AB compared to C (P<0.05); which was reflected in a best body weight at 21 d of age (*P<0.05*). No differences were observed between these treatments. A negative correlation was estimated between body weight and carvacrol intake (r: -0.55); but it was positive with thymol intake (r: 0.46). The results suggested that it is important to evaluate other OEO chemotypes in the process to generate an alternative for antibiotic growth promoters. This study founded other functional effects to OEO not associated with carvacrol content and antibacterial activity.

Key words: *broiler chicken, carvacrol, digestibility, thymol.*

Resumo

Os óleos essenciais de orégano (OEO) tem sido proposta como alternativa a los antibiótico promotores de crescimento em frangos de corte. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes quimiotipos de óleos essenciais de orégano (AEO) sobre a digestibilidade ileal (DI) da proteína, gordura e energia da dieta para frangos de corte aos 21 dias de idade. Seis tratamentos foram avaliados: 200 ppm de AEO a partir de 3 variedades produzidas e cultivadas na Sabana de Bogotá, Colômbia: *O. vulgare* L ssp *hirtum* (OH); *O. vulgare L*. (OL) y *O. majorana* (OM); 50 ppm de óleo essencial de *O. vulgare L* spp *hirtum* produzido e cultivado na Grécia (OG); 500 ppm de clortetraceclina (AB) e controle sem aditivo (C). Entre os dias 14 e 21, as aves receberam uma dieta inicial com 0.5 g/kg de óxido de cromo (Cr_2O_3) como indicador inerte. A digesta ileal foi coletada, foi analisado o contido de matéria seca, proteína, energia, gordura e cromo nas rações e na digesta e a DI foi calculada. O tratamento AB apresentou maior DI da proteína, em comparação com o grupo controle, 83.7 e 75.3%, respectivamente ($p<0.05$). A maior DI de energia e gordura foi para OM e AB em relação ao C, 92.3, 91.7 e 84.2%, respectivamente ($p<0.05$). Estes grupos também tiveram o maior peso aos 21 dias ($p<0.05$), sem diferenças aos 42 dias de idade. Foi observada uma correlação negativa entre o consumo de carvacrol e o peso corporal (r: -0.55) e uma correlação positiva com o consumo de timol (r: 0.46, $p<0.05$). Isso demonstra a importância de avaliar diferentes quimiotipos da AEO no processo de gerar uma alternativa aos antibióticos promotores de crescimento. Os resultados deste estudo também confirmaram outros efeitos funcionais não associados ao conteúdo de carvacrol da AEO.

Palavras chave: *carvacrol, digestibilidade, frangos de corte timol.*

Introducción

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) en la dieta de pollos de engorde han permitido mejorar la productividad y competitividad de la industria avícola (Dibner y Richards, 2005). Sin embargo, cada vez más países prohíben la utilización de APC, amparados en el principio de precaución debido a que los APC pueden conducir al desarrollo de resistencia bacteriana (Castanon, 2007).

Las restricciones al uso de APC unido a la creciente demanda de productos diferenciados, saludables y seguros, han abierto las puertas al uso de aditivos funcionales de origen natural, como los AEO (Zhang *et al.*, 2005).

Los AEO son mezclas de compuestos volátiles aislados de plantas medicinales que están constituidos principalmente por carvacrol y timol incluyendo sus precursores biosintéticos, el γ-terpineno y el *p*-cimeno (Russo *et al.*, 1998). Actualmente, se han reconocido múltiples efectos funcionales de los AEO y sus mezclas, tales como: antimicrobianos *in vitro* (Baricevic y Bartol, 2002), antioxidantes (Botsoglou *et al.*, 2002) antimicóticos, antiparasitarios y estimulantes de las secreción de enzimas digestivas (Hernández *et al*., 2004; Jang *et al.*, 2007) los aceites esenciales surgen entonces como una alternativa integral para su uso como pronutrientes en alimentación animal (Williams y Losa, 2002; Hernández *et al.*, 2004; Jamroz *et al*., 2005; Mitsch *et al.*, 2004), entre otros.

Sin embargo, los efectos de los aceites esenciales en pollos de engorde no han sido consistentes, mientras que algunos investigadores concluyen que el efecto de los AEO depende de las condiciones higiénico-sanitarias de las explotaciones (Lee *et al.,* 2003), otros estudios muestran que los AEO mejoraron la ganancia de peso corporal y la conversión alimenticia de pollos de engorde (Giannenas *et al.,* 2003).

La mayor importancia en el proceso de investigación y desarrollo tecnológico se ha dado para los AEO ricos en carvacrol (Nitsas, 2000), pero otros quimiotipos poco estudiados ricos en sabineno o en timol, podrían tener un efecto potencial más relevante como alternativa al uso de antibióticos en pollos de engorde. El presente estudio se planteó con el fin de evaluar el efecto de AEO procedente de tres principales quimiotipos de orégano, ricos en carvacrol, en timol y en sabineno, sobre la digestibilidad ileal (DI) de la proteína, la grasa y la energía y su relación con el desempeño productivo del pollo de engorde y la mortalidad por ascitis. Igualmente se planteó establecer la relación entre el consumo de carvacrol y timol con la respuesta fisiológica y productiva del pollo de engorde.

Materiales y Métodos

Alojamiento y diseño experimental

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones de Corpoica, Tibaitatá, km 14 vía Mosquera, Colombia, ubicado a 2547 msnm, con una temperatura media de 13°C, precipitación anual de 621 mm. Los pollos de engorde se alojaron en baterías provistas de fuente eléctrica de calor, comederos de canal, bebederos automáticos de copa, rejilla y bandeja de recolección de excretas.

Se utilizaron 750 pollos de engorde machos de 1 día de edad de la línea Hybro, distribuidos aleatoriamente en 6 tratamientos con 5 réplicas por tratamiento y 25 pollos por replica por un periodo de 42 días. Los pollos se manejaron de acuerdo a las directrices de las normas de cuidado y uso de animales del Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia. Las dietas se formularon sobre una base comercial de maíz y torta de soya y se diseñaron para cubrir los requerimientos nutricionales en las distintas fases de pollos en crecimiento (Rostagno *et al.*, 2005). Las dietas fueron fortificadas con premezclas de vitaminas y minerales (Tabla 1). Los tratamientos evaluados fueron: 200 ppm de AEO procedente de 3 variedades producidas y cultivadas en la Sabana de Bogotá, Colombia: *O. vulgare H.* (OH); *O. vulgare L.* (OL) y *O. majorana* (OM); 50 ppm de aceite esencial de *O. vulgare L* ssp. *hirtum* cultivado en Grecia (OG); 500 ppm de clortetraceclina (AB) y un grupo control sin ningún tipo de aditivo (C).

Extracción y análisis de aceites esenciales

Se obtuvieron tres quimiotipos de orégano de un cultivo comercial bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, el cual fue mantenido bajo un programa de riego y fertilización de acuerdo a los requerimientos del suelo. Las plantas se llevaron para su clasificación a la unidad de taxonomía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. El AEO de O. *Vulgare L* ssp. *hirtum* importado, fue obtenido en Estados Unidos y cultivado en Grecia. La extracción del AEO se hizo por el método de arrastre de vapor en un equipo tipo clevenger durante 3 horas. Los aceites se enviaron para su análisis por GC/MS en el

Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de identificar los metabolitos secundarios y componentes principales de los AEO.

Tabla 1. Dietas experrimentales

Ingredientes, g kg^{-1}	**Pre-inicio (1-7 d)**	**inicio (7-21 d)**	**Crecimiento 21-42 d**
Maiz	539.1	566.5	621.8
Torta de soya, 49% PC	277.1	254.0	203.2
Soya extruída	100.0	100.0	100.0
Aceite de palma	17.9	21.7	18.8
Harina de pescado	20.0	15.0	15.0
Fosfato dicálcico	14.3	13.6	12.0
Carbonato de calcio	12.2	11.7	10.9
Premezcal vitamin. y miner.*	2.0	2.0	2.0
Sal	3.5	3.5	3.5
Bicarbonato de sodio	3.0	3.0	3.0
L-Lisina HCl	1.9	1.2	1.8
DL- Metiionina	2.1	1.5	1.5
L-Triptofano	1.1	0.3	0.6
Choline HCl 60%	1.0	1.0	1.0
Composición calculada, %			
Proteína Cruda	22.61	21.14	19.40
E. M, kcal/g	3.000	3.050	3.100
Grasa	6.67	6.95	6.50
Calcio	0.96	0.90	0.82
Fosforo total	0.80	0.76	0.64
Fosforo disponible	0.48	0.45	0.41
BDE, mEq/kg	257	247	224
Lisina digestible	1.28	1.15	1.07
Metionina digestible	0.53	0.45	0.44
Total AAS	0.81	0.72	0.70
Treonina digestible	0.83	0.74	0.70

*Contenido por kg: Zinc 20.000 mg; Hierro: 8.400 mg; Manganeso: 35.000 mg; cobre: 1.700 mg; iodo: 430 mg; Selenio: 60 mg; vitamina A: 3.440.00UI; vitamina D3: 680.000UI; Vitamina E: 4.000UI; Colina: 172.000 mg; Niacina: 9.000 mg; Pantotenato de calcio: 3.060 mg; Vitamina B2: 1.430 mg; Vitamina B2: 1.430 mg; Vitamina K3: 856 mg; Vitamina B12: 4.6 mg.

Prueba de Digestibilidad Ileal

Los pollos se alimentaron a voluntad desde el día 1 hasta el día 14 con las dietas experimentales de preiniciación, desde el día 14 a 21, se suministró las dietas experimentales de iniciación, con 5 g de óxido de cromo como indicador /kg de alimento. El día 22 se sacrificaron 4 pollos por réplica, se removió el tracto gastro intestinal y se colectó la digesta ileal (20 cm desde la union ileo-cecal). Se mezcló el contenido ileal de los cuatro pollos y se liofilizó, se molió a 0.5 mm y se almacenó a -20ºC hasta su análisis químico (Jamroz et al., 2003; Hernández et al., 2004).

Análisis químico

Tanto en las dietas como en la digesta ileal se determinó el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 2006) y se calculó la proteína cruda como N x 6.25. La fracción lipídica se determinó por extracción con éter en el equipo Soxhlet durante 6 horas. La energía bruta se determinó en una bomba calorimétrica adiabática (Parr 1720) y el contenido de cromo se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica. Todos los valores se expresan sobre la base de materia seca. Con los resultados generados del análisis químico se determinó el coeficiente de digestibilidad ileal aparente para la proteína cruda, el extracto etéreo y la energía según la siguiente ecuación.

$$CDA = 100 - (100 \times (\%MA / \%MCi) \times (\%NCi / \%NA))$$

Donde, CDA es el coeficiente de digestibilidad aparente para cada principio nutritivo, %MA es el porcentaje de cromo en el alimento, %MCi es el porcentaje de cromo en el contenido ileal, %NCi es el porcentaje de nutriente en el contenido ileal %NA es el porcentaje de nutriente en el alimento (Virden *et al*., 2007).

Micrometría del epitelio intestinal

Las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica descrita por Wu *et al*. (2004). Se sacrificaron 5 pollos por tratamiento (uno por réplica) a los 3, 7, 14 y 21 días de edad, los pollos se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron segmentos de aproximadamente 2 cm del punto medio del duodeno,

yeyuno e ileon. Se lavaron los segmentos con solución de 0.9% de NaCl para remover el contenido intestinal y se fijaron en formaldehído buferizado al 4%. Se realizaron cortes de 5 µm, a los cuales se les aplicó una tinción con Hematoxilina-eosina y se ubicaron en láminas para la posterior determinación de las variables morfométricas. Se utilizó el analizador de imágenes computarizado, Image Analyzer Leco Instruments ® 2001, Versión 2.02, con un aumento de 40X. Se midió la profundidad de la cripta, altura de la vellosidad (l), ancho apical de la vellosidad (a) y ancho en la base (b), sobre 10 vellosidades adyacentes por muestra categorizadas en buen estado. De estos valores se derivó el área de la vellosidad como (a+b)/2 x l (Iji *et al*., 2001).

Análisis estadístico

El estudio se realizó bajo un diseño completamente al azar y los resultados se analizaron usando el procedimiento GLM (General Linear Model) de SAS Institute (2002). Se hicieron análisis estadísticos descriptivos, análisis de varianza y cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey para comparar la media de los tratamientos experimentales ($p<0.05$). Para establecer la relación entre el consumo acumulado de carvacrol y timol con el peso corporal a los 21 días de edad, se hizo un análisis de correlación. El porcentaje de mortalidad de cada tratamiento experimental fue comparado con la mortalidad del grupo control mediante pruebas de Chi Cuadrado.

Resultados

Composición de los AEO

Los componentes mayoritarios fueron el carvacrol, el timol y sus precursores, el ρ-cimeno y el γ-terpineno. O. *Vulgare L* ssp*. hirtum*, procedente de Grecia presentó un 50.8% de carvacrol, superior a O. *Vulgare L* ssp. *hirtum* nacional con 21.7%. El contenido de timol se encontró en un nivel más alto en *O. vulgare* L con 21.5%. En *O. majorana* se destaca el contenido especialmente alto de compuestos “sabinilo” con 24.7%, cuando se compara con las otras variedades (0.9-4.7%). Con base en estos resultados y el nivel de inclusión de AEO en la dieta se estimó el aporte de carvarol, timol y sabineno y sus derivados (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración estimada de carvacrol y timol (mg kg^{-1}) en las dietas

Componente	*OH*	*OM*	*OL*	*OG*
Sabineno y derivados	11.2	49.4	12.2	1.5
Carvacrol	43.4	7.4	8.6	25.4
Thyimol	9.4	20.0	43.0	3.8

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L* ssp*. hirtum*.; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.*; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. O. vulgare L* ssp*. hirtum*.

Digestibilidad Ileal

La digestibilidad ileal a los 21 días de edad se presenta en la Tabla 3. No se observaron diferencias significativas en la DI de proteína, extracto etéreo y energía en los grupos suplementados con AEO y con AB. Pero el grupo experimental alimentado con antibiótico, superó significativamente la DI de proteína, respecto al grupo control, con valores de 83.7 y 75.3%, respectivamente ($p<0.05$). Para el extracto etéreo, los grupos AB y OM presentaron la mejor DI, respecto al grupo control con DI 92.3 y 91.7% en relación con 84.2%, respectivamente ($p<0.05$). Esta tendencia fue similar para los valores de energía. Se observó una correlación significativa ($p<0.05$) entre la DI de la proteína (r: 0.67), el extracto etéreo (r: 0.99) y la energía (r: 0.91) con el peso corporal a los 21 días de edad ($p<0.05$) dentro de los grupos experimentales OH, OM, OG y AB.

Micrometría intestinal

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en las variables: altura de la vellosidad intestinal, profundidad de la cripta, área de la vellosidad y la relación entre altura de la vellosidad y profundidad de la cripta en yeyuno. No se observaron tendencias claras en función de los diferentes tratamientos. Pero cuando se hicieron análisis de correlación global entre estos parámetros con el peso corporal, se encontró una correlación significativa entre altura de la

vellosidad en yeyuno a los 3 d con el peso corporal a los 14 d (r: 0.59, p<0.01) y a los 42 d (r: 0.51, p<0.05) y el área de la vellosidad de yeyuno con el peso a los 14 días (r: 0.59, p<0.01) y a los 42 días (r: 0.56, p<0.01) . El peso corporal a los 21 días de edad mostró una correlación positiva con la altura de la vellosidad y relación altura de la vellosidad: profundidad de cripta de yeyuno a los 14 días de edad (*p<0.05*), mientras que el peso corporal a los 35 días se asoció con la altura de la vellosidad de íleon a los 3 días de edad (p<0.05).

Tabla 3. Digestibilidad ileal (%) de pollos de engorde alimentados con AEO en la dieta

Parámetro	OH	OL	OM	OG	AB	C	EEM
Proteína	76.2^{ab}	76.6^{ab}	80.5^{ab}	79.6^{ab}	83.7^{a}	75.3^{b}	1.763
Grasa	89.2^{ab}	90.7^{ab}	91.7^{a}	88.5^{ab}	92.3^{a}	84.2^{b}	1.577
Energía	69.4^{ab}	69.1^{ab}	70.6^{a}	67.6^{ab}	72.7^{a}	63.0^{b}	1.613

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L* ssp*. hirtum*.; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.*; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. O. vulgare L* ssp*. hirtum,* AB= 500 ppm de clortetraciclina; C= control sin aditivo.
$^{abc:}$ promedios con letras diferentes en sentido horizontal, presentan diferencias significativas, P<0.05. EEM: error estándar de la diferencia de medias

Cuando se analizó la longitud de las fracciones del intestino, se encontró que los grupos suplementados con AEO presentaron una mayor longitud en yeyuno e íleon respecto a los grupos no suplementados, AB y C (p<0.01). El consumo de AEO generó un efecto trófico sobre el yeyuno e íleon; es así como la longitud promedio en yeyuno de los grupos suplementados con AEO fue de 59.8 cm cuando se compara con los grupos no suplementados AB y C, 61.0 vs 54.1 cm, respectivamente (resultados no reportados)

Tabla 4. Micrometría del epitelio intestinal de Yeyuno de pollos de engorde alimentados con AEO

Semana	OH	OL	OM	OG	AB	C	*EEM*
Altura de la vellosidad (µm)							
3	421^{ab}	503^{a}	498^{a}	409^{ab}	401^{ab}	355^{b}	26.296
7	614	601	667	605	586	645	33.104
14	789	805	879	691	930	1009	83.806
21	920	915	895	969	1096	1009	66.834
Profundidad de cripta (µm)							
3	83^{ab}	94^{ab}	98^{a}	86^{ab}	77^{ab}	67^{b}	5.013
7	139^{ab}	112^{b}	140^{ab}	151^{ab}	169^{a}	156^{ab}	11.034
14	173	162	197	208	169	168	14.890
21	169	178	168	244	175	168	23.424
Área vellosidad (µm^2)							
3	11292	18008	17223	13981	13669	13875	1.571
7	26358^{ab}	23151^{b}	28502^{ab}	22536^{b}	36875^{a}	25902^{ab}	2.715
14	35564	42221	44204	43926	43877	47002	3.302
21	39743	40088	38456	48584	46777	47002	4.536
Altura vellosidad: profundidad de cripta							
3	5.4	5.4	5.1	4.8	5.3	5.1	0.411
7	4.5^{ab}	5.4^{a}	4.9^{ab}	4.1^{ab}	3.5^{b}	4.1^{ab}	0.290
14	4.6	5.4	4.7	3.3	5.5	6.1	0.585
21	5.5	5.4	6.3	4.3	6.3	6.1	0.762

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.* ssp*. hirtum*.; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L*.; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. vulagare L.* ssp*. hirtum*. AB= 500 ppm de clortetraciclina; C= control sin aditivo.

$^{abc:}$ promedios con letras diferentes en sentido horizontal, presentan diferencias significativas, $P<0.05$. EEM: Error estándar de la diferencia de medias

Comportamiento productivo de los pollos de engorde

El grupo suplementado con *O. majorana,* OM, mantuvo un peso corporal superior, a los 7 días respecto al grupo OH, a los 14 días respecto a OG y a los 21 días de edad, junto con CP y CN respecto a los grupos OG y OH ($p<0.05$). Al finalizar el ciclo de producción de 42 días, a pesar de mantenerse OM numéricamente un valor superior en peso corporal con 2453 g, los demás grupos experimentales cuyo peso corporal no superó los 2400 g, estas diferencias no fueron significativas (Tabla 5). Los grupos OM y OL presentaron un mayor consumo de alimento respecto a OH ($p<0.05$), pero al finalizar estas diferencias no fueron significativas, sin embargo, OH presentó un consumo más bajo (-6.5%) respecto a OL. La mejor conversión alimenticia se obtuvo en la segunda semana con los grupos suplementados con AEO y AB respecto a C ($p = 0.056$); pero la conversión acumulada hasta los 21 días no presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Tabla 5). Cuando se analizó la mortalidad, los grupos suplementados con antibiótico y AEO presentaron una reducción del 68% en la mortalidad por ascitis ($p<0.001$); resaltando que esta fue la única causa de mortalidad observada.

Relación entre el peso corporal y el consumo de carvacrol

Bajo las condiciones del presente estudio, cuando se correlacionó el consumo de carvacrol y timol (en grupos experimentales alimentados con AEO) con el peso corporal, se encontró que los grupos que presentaron un mayor consumo de carvacrol, obtuvieron el peso corporal más bajo, cuando se compara con los grupos de menor consumo de carvacrol ($p<0.05$), por el contrario, los grupos que consumieron más timol presentaron un mejor peso corporal ($p<0.05$). Esto fue confirmado por el análisis de correlación, encontrando un coeficiente de correlación entre el peso corporal y el consumo acumulado de carvacrol a los 21 d de -0.55, y -0.50 a los 21 y 42 d de edad ($p<0.05$). En contraste, se encontró un coeficiente de correlación positivo entre el peso corporal y el consumo de timol a los 21 días de edad con $r = 0.46$ ($p<0.05$) a los 21 d y 0.37 a los 42 d de edad.

Tabla 5. Parámetros productivos de pollos de engorde alimentados con AEO

Edad	OH	OL	OM	OG	AB	C	EEM
Peso corporal, g							
7	131^{b}	141^{ab}	143^{a}	135^{ab}	138^{ab}	140^{ab}	2.621
14	365^{ab}	392^{a}	387^{a}	358^{b}	374^{ab}	372^{ab}	6.613
21	739^{ab}	770^{ab}	778^{a}	724^{b}	779^{a}	770^{a}	13.181
42	2.359	2.443	2.453	2.385	2.390	2.394	87.248
Consumo de alimento, g/día							
7	15.1^{b}	17.2^{a}	17.0^{a}	15.8^{ab}	15.7^{ab}	15.3^{b}	0.619
14	41.8^{b}	44.3^{ab}	44.0^{ab}	41.9^{b}	42.5^{b}	45.7^{a}	0.967
21	74.2	74.8	77.5	72.4	77.1	77.0	2.825
Acum	3.595	3.830	3.764	3.747	3.772	3.790	77.182
Conversión, g:g							
7	1.17	1.20	1.17	1.18	1.14	1.10	0.040
14	1.25^{b}	1.24^{b}	1.27^{b}	1.32^{ab}	1.26^{b}	1.38^{a}	0.025
21	1.39	1.39	1.40	1.39	1.33	1.35	0.056
Acum	1.56	1.60	1.56	1.60	1.61	1.62	0.038
Mortalidad, %							
1-42d	5.5^{b}	2.2^{b}	6.7^{b}	8.3^{b}	4.4^{b}	13.3^{a}	0.001*

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.* ssp*. hirtum*.; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.*; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. vulagare L.* ssp*. hirtum*. AB= 500 ppm de clortetraciclina; C= control sin aditivo.

$^{abc:}$ promedios con letras diferentes en sentido horizontal, presentan diferencias significativas, $p<0.05$. *: Valor de P, prueba Chi cuadrado.

EEM: Error estándar de la diferencia de medias

Discusión

Composición y clasificación de AEO

El presente estudio se constituye en el primer reporte sobre la evaluación de los tres principales quimiotipos de orégano, altos en carvacrol (*O. vulgare H*), altos en timol (*O. vulgare L*) y altos en sabineno y sus derivados (*O. majorana*) cultivados en la Sabana de Bogotá. Los componentes predominantes en *O. vulgare* fueron los compuestos fenólicos carvacrol, timol y sus precursores, Kokkini (1997) reportó similares resultados en *O. vulgare.* En el presente estudio, carvacrol, timol, γ-terpineno y p-cimeno, sumados totalizaron 61.24% en *O. vulgare L* y 67.01% en O. *Vulgare L* ssp*. hirtum*. La superioridad en el contenido de carvacrol del AEO importado, estaría explicada posiblemente por las condiciones agroecológicas diferentes a los sistemas de producción bajo invernadero en la Sabana de Bogotá. Sangwan (2001) señala que las vías metabólicas de síntesis de metabolitos secundarios en las plantas medicinales son moduladas por la fisiología de la planta y factores ambientales que la afectan como la ontogenia de la planta, la fotosíntesis, el fotoperiodo, el clima, la intensidad de luz, la humedad, entre otros, los cuales pudieron determinar la composición de las variedades estudiadas en el presente trabajo.

Se ha generalizado que el AEO procedente de *O. vulgare L. ssp. hirtum*, conocido también como orégano Griego, es el de mejor calidad, debido a su alto contenido de carvacrol y alto rendimiento de aceite esencial (7 ml/100 g MS), mostrando contenidos de carvacrol entre 79.5 y 93%, por lo que se clasifica a esta subespecie como un orégano tipo carvacrol (Goliaris *et al*., 2002). Sin embargo, en las especies cultivadas en la Sabana de Bogotá, el contenido de carvacrol no superó el 22%. *O. vulgare L,* por el contrario, mostró un contenido mayor de timol, Mockute *et al.* (2001) comprobaron altos contenidos de timol en algunos quimiotipos de *O.vulgare L.* ssp vulgare en Italia. En *O. majorana*, por el contrario, el componente mayoritario fue el transhidrato de sabineno, característico de este quimiotipo; kokkini (1997) también encontró que sabineno es el componente mayoritario de *O. majorana.* Estos resultados indican que a pesar de la variación en la composición de aceites esenciales por efecto del ambiente, la quimiotipificación puede ser una herramienta útil para la clasificación y valoración funcional del orégano.

Digestibilidad Ileal

La secreción de enzimas y jugos digestivos es un factor esencial para la digestión de los alimentos, los extractos de plantas pueden estimular la producción de saliva y jugos gástricos, ácidos biliares y jugo pancreático, favoreciendo el proceso de digestión (Platel y Srinivasan, 2003; Cross *et al*., 2007). Otro factor asociado con la digestibilidad es el tiempo de permanencia del alimento en su tránsito por el tracto gastrointestinal, Manzanilla *et al*. (2004) comprobaron que una mezcla de extractos de plantas, modificaron la tasa de vaciado del estómago en cerdos destetos. Posiblemente, estos efectos soportan y explican la mejor digestibilidad ileal obtenida en el presente estudio con la inclusión de AEO respecto al grupo control. Hernández *et al.* (2004) encontraron que la inclusión de una mezcla de extractos de plantas (orégano, canela y tomillo) en la dieta de pollos de engorde, mejoró la digestibilidad ileal y total de materia seca, extracto etéreo y almidón, pero no encontraron efectos sobre la digestibilidad de la proteína. En el presente estudio sí se observó una mejor DI para la proteína con la inclusión de AEO y AB en la dieta de pollos de engorde.

Si bien son diversos los factores que afectan la eficiencia alimenticia, como un incremento en el consumo de alimento, reducción de los requerimientos de mantenimiento, la reducción de la grasa corporal y un incremento en la digestibilidad y metabolizabilidad de la dieta, cerca del 97% de la variación de la metabolizabilidad, está explicada por la variación en la digestibilidad (Mignon-Grasteau *et al*., 2004) lo cual podría explicar la asociación directa encontrada entre la digestibilidad ileal de la proteína, la grasa y la energía con el peso corporal de los pollos de engorde. La edad es otro factor determinante de la digestibilidad, Noy y Sklan (1995) explicaron que a las 3 semanas de edad se observa una estrecha correlación entre el consumo de alimento y la digestibilidad porque el TGI alcanza su máximo desempeño digestivo en términos enzimáticos. Sin embargo, cuando se analiza el grupo control, a pesar de presentar un menor porcentaje de digestibilidad, el peso corporal fue comparable a los grupos experimentales OM y AB. Este comportamiento se explicaría posiblemente porque si bien hay compartimentos determinantes para la expresión productiva de

los animales como el digestivo, dicha expresión es de carácter multifactorial y posiblemente factores como la densidad de aves debido a una mayor mortalidad en los en los grupos experimentales C, conduciría a una mayor disponibilidad de equipo y y confort de los pollos de engorde, mejorando el comportamiento.

Micrometría intestinal

El epitelio intestinal y células asociadas se constituyen en una barrera dinámica y metabólicamente activa con permeabilidad selectiva para la máxima función digestiva y absortiva (Mitchel y Moretó, 2006). La estructura y la función de la mucosa intestinal depende del balance entre la proliferación, migración y apoptosis (Murakami *et al.*, 2007). La función principal de las células de las criptas son secretoras y las células del epitelio son absortivas. Por consiguiente, la micrometría del intestino es un parámetro importante de los estudios que evalúan el efecto de aditivos en la dieta de pollos de engorde. Se reporta una asociación entre un mejor comportamiento de los pollos de engorde y una mayor altura y área de la vellosidad intestinal por efecto de la inclusión de extracto de caña han sido comprobados por Yamauchi *et al*. (2006); de otra parte, Xia *et al.* (2004) asociaron una mayor relación vellosidad: cripta en el intestino delgado de pollos a un menor contenido de *E. coli* y *Clostridium*. En contraste, Miles *et al*. (2006) obtuvieron una reducción en el área total de la vellosidad, la altura de la vellosidad y profundidad de la cripta en íleon por efecto de la inclusión de virginiamicina, sin observar una relación directa de estos parámetros con el comportamiento productivo de los pollos de engorde. En el presente estudio, los parámetros de la vellosidad intestinal de yeyuno estuvieron relacionados con el peso corporal a los 14, 21 y 42 días de edad de los pollos de engorde.

En general se afirma que el estado de las vellosidades intestinales y células epiteliales es un buen indicador de la absorción de nutrientes, de tal forma que las alteraciones en la histología intestinal se podrían asociar con la dieta, activando las funciones intestinales para promover el crecimiento y la inmunoestimulación (Yamauchi *et al*., 2006), pero como se indicó anteriormente, los resultados de los diferentes estudios en pollos de engorde, son aún contrastantes en este aspecto.

Analizando el crecimiento de la vellosidad, se reporta que el desarrollo completo de la vellosidad en yeyuno e íleon se logra 14 días post nacimiento (Uni, 1999), pero en

el presente estudio se encontró que el crecimiento se mantuvo hasta 21 días, incluso, Kondo (2003) observó un desarrollo gradual hasta 36 días post nacimiento. Los antioxidantes como la vitamina E se han asociado a un mejor desarrollo de la mucosa intestinal en pollos de engorde. Considerando que los AEO tienen un efecto antioxidante, podría esperarse un efecto positivo sobre el epitelio intestinal (Murakami *et al.*, 2007). Sin embargo, no hubo una respuesta clara por efecto de la suplementación de los AEO en el presente estudio.

Comportamiento productivo

Los resultados de los efectos de AEO no han sido muy consistentes, mientras que Botsoglou *et al*. (2002) no reportaron efectos de los AEO en el crecimiento de pollos de engorde, otros estudios han encontrado un mejor comportamiento productivo (Giannenas *et al.,* 2003). Los efectos positivos de los extractos de plantas sobre el comportamiento de los pollos de engorde también han sido atribuidos a su actividad antimicrobiana, Jamroz *et al*. (2005) observaron una reducción de *E. coli, C. perfringens* y hongos, así como un aumento de *Lactobacillus* spp por efecto de la suplementación con una mezcla de capsaicina, cinamaldehido y carvacrol. Sin embargo, Ultee *et al.* (2002) señalan también que si bien la actividad antibacterial de carvacrol y timol se basa en su efecto desestabilizante de la membrana celular bacteriana, este efecto podría conducir a problemas secundarios en el animal, si no se dosifica adecuadamente. En el presente estudio, los grupos suplementados con AEO de mayor contenido de carvacrol fueron los que presentaron un menor peso corporal. En estudios previos se ha comprobado que el carvacrol puede presentar respuestas adversas en el consumo de alimento y ganancia de peso corporal, como lo reportaron Lee *et al*. (2003) con la inclusión de 200 ppm de carvacrol en la dieta de pollos de engorde. Dušan *et al*. (2006) comprobaron también un efecto citotóxico de AEO comerciales con 55% de carvacrol sobre células Caco-2 en dosis altas, pero con dosis media (0.37 mM) la toxicidad y muerte celular fue baja. Posiblemente la dilución en la que se utilice el AEO así como el vehículo sea un factor importante para considerar en el desarrollo de un producto a nivel comercial. Force *et al*. (2000) advirtieron que una exposición de la mucosa intestinal a AEO

concentrados, no emulsionados, puede causar irritación localizada. Con los niveles de inclusión utilizados en el presente estudio, los AEO ricos en carvacrol no tuvieron los efectos positivos esperados, lo cual sugiere que el nivel de inclusión puede ser un factor determinante en la respuesta productiva de los pollos de engorde.

En este estudio se comprobó que los AEO procedentes de distintos quimiotipos de orégano pueden tener efectos diferentes sobre el comportamiento productivo de los pollos de engorde, lo cual pudo estar directamente relacionado con el contenido y proporción de carvacrol y timol de los mismos, así como de otros metabolitos secundarios dominantes como sabineno en *O. majorana*. Constituyéndose en el primer estudio que evalúa el efecto de los tres principales quimiotipos de AEO sobre el comportamiento de pollos de engorde; así como el primer trabajo que reporta asociaciones entre diferentes niveles de consumo de carvacrol y de timol con la expresión productiva de los pollos de engorde. Cross *et al*. (2007) llegaron a conclusiones similares cuando evaluaron la inclusión de extractos de plantas de diferentes especies. Se destaca principalmente una respuesta diferencial frente al consumo de timol, el cual estuvo positivamente asociado con el consumo de alimento y peso corporal. Lee et al. (2003) comprobaron también con la inclusión de 200 ppm de timol no se presentan efectos adversos observados con el consumo de carvacrol.

La calidad de la dieta y las condiciones ambientales son factores importantes cuando se evalúa la respuesta productiva de los pollos de engorde frente al uso de aditivos. Lee *et al*. (2003) concluyeron que posiblemente, bajo condiciones ambientales menos higiénicas que las experimentales o con dietas de baja digestibilidad se podría obtener efectos positivos de los constituyentes de extractos de plantas. En efecto, cuando se ha evaluado AEO comerciales con reto con coccidia, se mejora el comportamiento productivo de los pollos de engorde (Giannenas et al., 2003). Se ha demostrado también que el ambiente en el cual se crían los animales podría modificar la microflora intestinal y el grado de contaminación ambiental afectaría la respuesta de los pollos de engorde a los promotores de crecimiento (Tannok, 1998). Las aves levantadas en piso pueden mostrar más infección con patógenos que las levantadas en batería (Willis *et al.*, 2002). Esto podría explicar que bajo las condiciones experimentales del presente estudio, en batería, no se observaron efectos significativos de los aditivos

promotores de crecimiento, AEO y AB, sobre el peso corporal y la conversión de alimento en pollos de engorde.

Finalmente, la menor mortalidad causada por ascitis, observada en el presente estudio con la inclusión de aditivos AEO y AB en la dieta de los pollos de engorde, podría estar explicada por un mejor desempeño y homeostasis del tracto gastrointestinal. Los aceites esenciales de orégano tienen tambien propiedades antiinflamatorias y potenciadoras del sistema inmune que podrían explicar los efectos positivos de estos AEO. Los trabajos de Chichlowski *et al*. (2007) encontraron la mejor eficiencia metabólica vía cambios en la fisiología intestinal, alterando las citoquinas pro y antiinflamatorias, reduciendo en un 17% el consumo de oxígeno (demanda) en toda la masa corporal vía reducción del metabolismo intestinal, con la inclusión de un probiótico en la alimentación de pollos de engorde. La alteración de la función inmune puede incrementar la tasa metabólica hasta en un 27% (Martin *et al*., 2003) y este tipo de aditivos por su efecto modulador de la respuesta inmune e inflamatoria, podrían generar una reducción de la tasa metabólica, la demanda de oxígeno y la susceptibilidad al síndrome ascítico. Sin embargo, se requieren estudios más precisos a este nivel para comprobar bajo condiciones de estrés de altitud y frío los mecanismos por los cuales los AEO y los AB lograron reducir la mortalidad por ascitis.

En conclusión, bajo las condiciones del presente estudio, se pudo comprobar otros efectos funcionales para los AEO, como una mejor digestibilidad ileal para la proteína, grasa y energía. El comportamiento productivo de pollos de engorde alimentados con AEO se asoció directamente con el consumo de timol. Estos resultados podrían abrir posibilidades de investigación y de mercado con variedades nativas con un alto contenido de timol, adaptadas a condiciones áridas y en ambientes extremos de América tropical.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Universidad de La Salle por la financiación del estudio, Corpoica donde se hizo el experimento, Doctor Aureliano Hernández, director del Laboratorio de Morfofisiología, Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, Dr. Luis Enrique Cuca,

dir. Lab. Fitoquímica, por sus recomendaciones para la extracción y manejo de los aceites esenciales.

Referencias

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA; 2006.

Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the Origanum Genus. In: Spiridon EK, editors. Oregano, the genera Origanum and Lippia. New York: Taylor & Francis Inc.; 2002. p.177-201.

Botsoglou NA, Florou-Paner P, Christaki E, Didry DJ, Fletouris NL, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. Br Poult Sci 2002; 43:223-230.

Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. Poult Sci 2007; 86:2466-2471.

Chichlowski M, Croom J, McBride BW, Daniel L. Direct-fed microbial PrimaLac and salinomycin modulate whole-body and Intestinal mucosal cytocine production in broiler chick. Poult Sci 2007; 86:1100-1106.

Cross DE, Mcdevitt RM, Hillman K, Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. Br Poult Sci 2007; 48:496-506

Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult Sci 2005; 84:634-643.

Dušan F, Sabol M, Katarína D, Dobroslava B. Essential oils-their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability. Toxicol in Vitro 2006; 20:1435-1445.

Force M, Sparks WS, Ronzio RA. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. Phytother Res 2000; 14:213-214.

Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with Eimeria tenella. Arch Anim Nutr 2003; 57:99-106.

Goliaris AH, Chatzopoulou PS, Katsiotis ST. Production of new Greek oregano clones and analysis of their essential oils. J Herbs Spices Med Plants 2002; 10:29-35.

Hernández F, Madrid J, García V, Orengo J, Megía MD. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poult Sci 2004; 83:169-174.

Iji PA, Saki A, Tivey DR. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. Br Poult Sci 2001; 42:505-513

Jamroz D, Orda J, Kamel C, Wiliczkiewicz A, Wertelecki T, Skorupinska J. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. J Anim Feed Sci 2003; 12:583-596.

Jamroz D, Wiliczkiewicz A, Wertelecki T, Orda J, Sukorupinska J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. Br Poult Sci 2005; 46:485-493.

Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. Anim Feed Sci Technol 2007; 134:304-315.

Kokkini S. Taxonomy, diversity, and distribution of Origanum species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy 1997; I:2-11.

Kondo N. Estudo das características morfométricas de diferentes regiões do intestino delgado e índices zootécnicos em quatro linhagens de frangos de

corte. Tese de Doutorado. Facultad de Medicina Veterinária e Zootectia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil. 2003.

Lee[1] KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. Effect of dietary essential oils on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br Poult Sci 2003; 44:450-457.

Lee[2] KW, Everts H, Kappert HJ, Yeom KH, Beynen AC. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. J Appl Poult Res 2003; 12:394-399.

Manzanilla EG, Perez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F, Gasa J. Nov effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. J Anim Sci 2004; 82:3210-3218.

Martin LB, Scheuerlein A, Wikelski M. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrws: A link between direct and indirect costs? Proc Biol Sci 2003; 270:153-158.

Mignon-Grasteau S, Muley N, Bastianelli D, Gomez J, Péron A, Sellier N, Millet N, Besnard J, Hallouis J-M, and Carré B. Heritability of digestibilities and divergent selection for digestion ability in growing chicks fed a wheat diet. Poult Sci 2004; 83:860-867.

Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Kohler B, Gabler C, Losa R, Zimpernik I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of Clostridium perfringens in the intestines of broiler chickens. Poult Sci 2004; 83:669-675.

Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of Origanum vulgare L. ssp. vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania). Phytochemistry 2001; 57:65-69.

Nitsas FA. Pharmaceutical composition containing herbal-based active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. United States Patent 6, 106, 838, 22 August; 2000.

Noy Y, Sklan D. Digestion and absorption in the young chick. Poult Sci 1995; 74:366-373.

Platel K, Srinivasan K. Stimulatory influence of select spices on bile secretion in rats. Nutr Res 2003; 20:1493-1503.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2a ed. Editora UFV, Viçosa; 2005.

Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (Origanum vulgare ssp. hirtum (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. J Agric Food Chem 1998; 46:3741-3746

Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regul 2001; 34:3-21.

SAS Procedures Guide (Version 9). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2002. Tannock GW. Studies.

Tannock GW. Studies of intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. Int Dairy J 1998; 8:527-533.

Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl Environ Microbiol 2002; 68:1561-1568.

Uni Z. Functional development of the small intestine in domestic birds: cellular and molecular aspects. Poult Avian Biol Rev 1999; 10:167-179.

Virden W S, Lilburn MS, Thaxton JP, Corzo A, Hoehlerddagger D, Kidd MT. The effect of corticosterone-induced stress on amino acid digestibility in Ross broilers. Poult Sci 2007; 86:338-342.

Williams P, Losa R. Blending essential oils for poultry. Feed Mix 2002; 10:8-9.

Willis WL, Murray C, Talbott C. Campylobacter isolation trends of cage versus floor broiler chickens: one year study. Poult Sci 2002; 81:629-631.

Wu YB, Ravindran V, Thomas DG, Birtles MJ, Hendriks WH. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. Br Poult Sci 2004; 45:76-84.

Zhang KY, Yan F, Keen CA, Waldroup PW. Use of essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. Int J Poult Sci 2005; 4:612-619.

CAPÍTULO 4

Efecto de la suplementación con aceites esenciales de orégano sobre la microflora digestiva y el comportamiento productivo de pollos de engorde machos

Liliana Betancourt†*, Fernando Rodriguez‡, Vienvilay. Phandanauvong‡, Claudia Ariza-Nieto‡, Michael Hume§, David Nisbet§, and †Germán Afanador-Téllez.

†Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, *Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia, ‡CORPOICA, Bogotá, Colombia, §USDA, ARS, FFSRU, College Station, TX, USA

Artículo ajustado a las normas de la revista Poultry Science.

Abstract buplicado en: Poult. Sci. Vol. 89, E-Suppl. 1 pag. 605; J. Anim. Sci. Vol. 88, E-Suppl. 2; J. Dairy Sci. Vol. 93, E- Suppl. 1.

Dietary supplementation effects of oregano essential oils on digestive microflora and performance of male broilers at high altitude

ABSTRACT

Essential oils have been proposed as alternatives to antibiotic use. This study evaluated three chemotypes of oregano, carvacrol-type, thymol-type and sabinene-type, cultivated at high altitude, in broiler chicken diet. Aerial parts of *O. vulgare L* (OL), *O. vulgare L* ssp. *hirtum* (OH) and *O. majorana* (OM) were collected from a greenhouse on the high altitude Sabana de Bogotá and *O. vulgare L* ssp. *hirtum* (OG) produced and ground in Greece. Oregano essential oils (OEO) from these plants were obtained by steam distillation and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer. Six treatments were evaluated as broiler feed supplements: 200 ppm of OEO from each of the 3 OEO chemotypes, 1) OH; 2) OL and 3) OM; 4) 50 ppm of EO from OG; 5) 500 ppm Chlortetracycline (AB); and 6) control (C) with no treatment. Template DNA was isolated from duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon contents in each group and analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The OG showed the highest carvacrol content, 50.8%. *O. majorana* was represented mainly by sabinene and cis- and trans-sabinene hydrates (21.4%). Dendrograms revealed two main clusters, OEO-treated chicks and non-treated control chicks, in each intestinal segment. DNA profiles from different gut compartments revealed major bacterial population shifts in the foregut (duodenum, jejunum and ileum) compared with the hindgut (cecum and colon) at two periods evaluated ($P < 0.05$). The OEO treatments showed the fewer shifts between these two clusters different to the control groups AB and C. A reduction average of 59% in mortality from ascites was seen of all additive-supplemented groups compared to C group were observed. This study represents the first evaluation of the three main chemotypes of *origanum* gender in broiler diets under high altitude and cold stress conditions.

Key Words: Essential oil, carvacrol, thymol, oregano, high altitude, DGGE

INTRODUCTION

The use of antibiotics as growth promoters in animal feed has been decreasing over the last few years. This technological shift has stimulated the search for alternative supplements in animal production and plant essential oils are among these targeted alternative growth promoters (Williams and Losa, 2002; Lee et al., 2003; Hernández et al., 2004). Plant extracts are characterized by several effects including antimicrobial activity (Aligiannis et al., 2001; Baricevic and Bartol, 2002), as well as stimulation of appetite and secretion of endogenous enzymes, increased digestibility, and having antioxidant and immunostimulant properties in humans and other animals (Bakkali et al., 2008). These properties in oregano essential oils (OEO) were attributed to the presence of hydroxyl groups in their phenolic components, e.g., thymol and carvacrol (Ben et al., 2006). This free hydroxyl group and a delocalized system allows proton exchange, increasing the permeability of the cytoplasmic membrane to adenosine triphosphate (ATP) and allowing ions to leave the cytoplasm (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001). The overall inhibitory effects by OEO can be attributed mainly to the additive antimicrobial action of carvacrol and thymol (Lambert et al., 2001). Despite their additive effects, more attention and importance have been given to carvacrol, and especially the more valued Greek oregano, due to its high content of carvacrol.

The results are controversial due to the fact that OEO dietary supplementation improved growth in some cases (Giannenas et al., 2003), while other studies demonstrated no effects on broiler growth performance (Botsoglou et al., 2002). The OEO present a broad spectrum of antibacterial activity and physiological effects (Dorman and Deans, 2000; Aligiannis et al., 2001). However, the antimicrobial action of these phytochemicals likely do not contribute significantly to the overall efficacy of this class of compound as feed additives, because antibacterial levels used *in vitro* considerably exceeded the dietary doses commonly used for feed animals. None the less, essential oils have been shown to play a significant role in the modulation of gut microflora (Hume et al., 2006; Oviedo-Rondón et al., 2006) and the colonization of pathogenic bacteria (Jamroz et al., 2003). The normal intestinal microbiota is regarded as a first defense against exogenous and endogenous, potentially pathogenic microorganisms (Guarner and Malagelada, 2003; Amit-Romach et al., 2004).

There are several studies in the literature reporting on the antimicrobial activity and composition of OEO (Hammer et al., 1999; Dorman and Deans, 2000, Aligiannis et al., 2001). However, the effects of different carvacrol: thymol ratios on intestinal microbial communities and their incidence of ascites at high altitude in broilers have been little studied in oregano's cultivation at high altitude. Ascites syndrome is a metabolic disorder with significant economic losses in broilers (Pakdel et al., 2005) and the most important environmental factors causing the development of this syndrome are high altitude and cold temperatures (Shlosberg et al., 1996). Thus, the objective of this study was to explore the effects of supplementation of different chemotypes of OEO on the intestinal microbiota of broiler chickens using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Three oregano commercial cultivars were cultured at high altitude in the Sabana of Bogotá to determine its OEO content and to compare it with the commercial Greek variety. Additionally, the effects of these OEO extracts were determined on the incidence of ascites in broilers at high altitude conditions.

MATERIALS AND METHODS

Essential Oil Extraction

Aerial parts of *O. vulgare L*, *O. vulgare L* ssp. *hirtum* and *O. majorana* were collected (50 kg each) from a commercial greenhouse crop of oregano located in Sabana de Bogotá, Colombia. The plants were identified by the Herbarium of the Faculty of Science at National University of Colombia. Essential oils from these plants were obtained by steam distillation for 3 hours using a Clevenger-type apparatus. The steam and oil mixture was cooled through a condenser and the condensate was collected to allow a phase separation (Vazquez and Dunford, 2005). Oregano essential oils were stored in dark containers and kept at 4°C prior to further analysis. Essential oil ratios of the plants were determined as volumetric (ml/100g) (Wichtl, 1971).

Essential Oil Analysis

The OEO were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer in an Agilent Technologies (Santa Clara CA). A 6890 Plus gas chromatograph coupled with

an ion trap detector mass spectrometer equipped with a FID detector and a DB-5 capillary column (J and W Scientific, Folsom, CA), 60 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 um, (5%-phenyl-methylpolysiloxane column) was used for quantification and linear retention indices determination. Injector and detector temperatures were at 240^{o}C; split ratio, 5:1 mL/min. The essential oils constituents were identified by comparison of their relative retention times and mass spectra using the NIST data base and Wiley Registry of Mass Spectral Data. A standard solution of n-alkanes was used to obtain the retention indices (Chromatography Laboratory of Universidad Industrial de Santander).

Animal Husbandry and Treatments

Seven hundred and fifty one-day-old commercial Hybro male broiler chicks were maintained at the high altitude of the Sabana de Bogotá (2650 mosl). They were placed in 30 brooder cages under a completely randomized design. Chicks were fed *ad libitum* a corn-soy diet that met or exceeded NRC requirements (1994) (Table 1). A pre-starter diet was provided for the first 7 days of age and it was replaced by starter diet until broilers were 21 days of age. Grower diets were provided for the remainder period until 42 days of age. Six treatments were evaluated: 200 ppm of OEO from each of the 3 OEO chemotypes, 1) *O. vulgare*L. *spp. hirtum* (OH); 2) *O. vulgare* L. (OL) and 3) *O. majorana* (OM); 4) 50 ppm of EO from *O. vulgare* spp. *hirtum* cultured and ground in Greece (OG); 5) 500 ppm of chlortetracycline (AB); and 6) control (C) with no treatment. Essential oils inclusion levels were defined based on the contents of carvacrol and thymol. Body weight, feed intake, feed conversion, and percent of mortality were registered until 42 days of age. Mortality was recorded daily, and all of the dead birds were examined during the study for lesions of heart failure and ascites.

Sample Collection

Fifteen chicks randomly selected from each treatment for each period, start (21 days of age) and growth (42 days of age) were sacrificed by cervical dislocation and digestive tracts were aseptically removed. Duodenum (duodenal loop), jejunum (from

duodenal loop end to Mekel´s diverticulum), ileum (from Mekel´s diverticulum to ileocecal junction), and cecum and colon were removed and the contents from each section were also collected aseptically. Samples of intestinal content from each segment of five chickens were pooled to reduce individual within group variation (Zhou et al., 2007). In total, 1.35 g of intestinal content from each section was suspended in 12.15 mL of sterile

Table 1. Basal experimental diets

Ingredients, g kg^{-1}	**Pre-start. (1-7 d)**	**Starter (7-21 d)**	**Growth 21-42 d**
Corn	539.1	566.5	621.8
Soybeanmeal, 49% CP	277.1	254.0	203.2
Extrudedsoybean	100.0	100.0	100.0
Palm oil	17.9	21.7	18.8
Fishmeal	20.0	15.0	15.0
Dicalciumphosphate	14.3	13.6	12.0
Calcium carbonate	12.2	11.7	10.9
Vitamin-mineral trace	2.0	2.0	2.0
Salt	3.5	3.5	3.5
SodiumBicarbonate	3.0	3.0	3.0
L-Lysine HCl	1.9	1.2	1.8
DL- Metihionine	2.1	1.5	1.5
L-Tyiptophan	1.1	0.3	0.6
Cl Choline 60%	1.0	1.0	1.0
Calculated composition, %			
Crudeprotein	22.61	21.14	19.40
M.E., kcal/g	3.000	3.050	3.100
Fat	6.67	6.95	6.50
Calcium,	0.96	0.90	0.82
Total phosphorus	0.80	0.76	0.64
Available phosphorus	0.48	0.45	0.41
DEB, mEq/kg	257	247	224
Dig. Lysine	1.28	1.15	1.07
Dig. Methionine	0.53	0.45	0.44
Total SAA	0.81	0.72	0.70
Dig. Threonine	0.83	0.74	0.70

DEB: dietary electrolyte balance. Dig. Lysine: digestible Lysine

Butterfield's buffer (0.62 mM KH_2PO_4, pH 7.2) and stored at -20ºC for further analysis.

Bacterial DNA Isolation

The DNA was extracted from 1 mL of stored intestinal samples using a modified protocol (Denman and McSweeney, 2005), which combines freezing and bead-beating with SDS and lysozyme treatment. Briefly, pellets were collected by centrifugation at 20,000 × *g* for 5 min and resuspended in 1 mL of lysis buffer (2%, wt/vol) SDS, 100 mMTrisHCl, 5 mM EDTA, 200 mMNaCl, pH 8.0) and 100 µL of potassium acetate solution pH 5.5 – 6.0 (29.4% (wt/vol) of potassium acetate, 11.5% (vol/vol) of glacial acetic acid. Suspensions were frozen in liquid nitrogen and thawed in boiling water for 3 min. The samples were bead-beaten for 2 min at maximum speed on a Mini-Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, OK) using 1.0 mm diameter glass beads (0.25 g). The freezing-thawing and bead-beating steps were repeated. Lysozyme (0.15 mg/mL final concentration) was added and the mixture was incubated at 37°C for 1.5 h. Subsequently, DNA samples were precipitated by adding glassmilk (16.7%, wt/vol) of silica (Sigma S-5631) and washed with 100% ethanol. Finally, the DNA was suspended in 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer and stored at -20°C.

Amplicons

Concentrations and purity measurements of DNA were conducted by using a Nanodrop ND-100 spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE). Denaturing gradient gel electrophoresis was run according to method of Hume et al. (2003) and Muyzer et al. (1993). Primers for the domain *Bacteria* were used for amplification of the highly variable V3 region on the 16S rDNAgene and PCR was performed in a total volume of 25 µL.

Sample DNA (250 ng) was added to Jump Start Red-Taq Ready Mix (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) containing 25 pmol of each primer (primer 2, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', and primer 3 with a 40-base G-C clamp (Muyzer et al., 1993; Sheffield et al., 1989) 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCG GGGCGGGGGC ACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'). The reaction was carried out on a PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA) with the following program: 1) denaturation at 94°C for 2 min; 2) subsequent denaturation at 94°C for 1 min; 3) annealing at 67°C for 45 sec; -0.5°C per cycle (touchdown to minimize spurious by-

products (Don et al., 1991; Wawer and Muyzer, 1995); 4) extension at 72°C for 2 min; 5) repeat steps 2 to 4 for 17 cycles; 6) denaturation at 94°C for 1 min; 7) annealing at 58°C for 45 sec; 8) repeat steps 6 to 7 for 12 cycles; 9) extension at 72°C for 7 min; and 10) hold at 4°C.

Gel Electrophoresis

Samples from PCR were mixed with an equal volume of 2X loading buffer (0.05% (wt/vol) bromophenol blue, 0.05% (wt/vol) xylene cyanol, 70% (vol/vol) glycerol and run on polyacrylamide gels 8% (vol/vol) acrylamide-bisacrylamide ratio 37.5:1, Bio-Rad Laboratories; Richmond, CA) cast with a 35 to 60% urea-deionized formamide gradient (100% was 7 M urea and 40% deionized formamide). A DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) was used for electrophoresis with 1x TAE buffer (20 mMTris (pH 7.4), 10 mM sodium acetate, 0.5 M EDTA) at 59°C for 17 h at 60 V. Gels were stained with SYBR Green I (Sigma) and fragment pattern relatedness was determined with Molecular Analysis Fingerprinting Software, version 1.6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Statistical Analysis

After separation of amplicons by DGGE, the similarity coefficient (SC) was determined as SC = [2j/ (a + b)] × 100 (McCracken et al., 2001), where a is the number of bands in one sample, b is the number of bands in another sample, and j is the number of common DGGE bands. The SC represented the degree of similarity of banding patterns between pairs of samples. A distance matrix was calculated and dendograms were constructed using Pearson product-moment correlation coefficient. Coefficient of similarity for principal clusters and SC between and within principal clusters (OEO and none-OEO (foregut and hindgut) were computed and subjected to 1-way ANOVA with factorial arrangement of 2 x 2 x 3 (SC of OEO treated and non-OEO treated; start and growth period; and foregut vs hindgut) to compare the effect of treatments and gut compartments for each period. Productive performance in terms of feed intake, body weight, feed conversion and mortality were analyzed as a completely randomized design. Treatment means were tested for significance using General Linear Models (GLM) procedure of SAS

software (SAS Institute, 2002). Group treatment differences were determined by Tukey's test, and means differences were considered significant at $P< 0.05$.

RESULTS

Composition of Oregano Essential Oils

The main metabolites found in the OEO analyzed are presented in Table 2. As a result of grouping according to the essential oil main components, three different chemotypes, carvacrol, tymol and sabinene were identified in the cultivars. Major compounds present in the *Origanum* spp. were aromatic mono-terpenes, as thymol, carvacrol, and their precursors, p-cymene and γ-terpinene. *Origanum vulgare L* ssp*. hirtum* showed the highest carvacrol concentration, 50.8%. Other compounds found were thymol (7.7%), p-cymene (19.0%) and γ-terpinene (5.0%). *Origanum majorana* was represented mainly by sabinene (4.3%) and cis- and trans-sabinene hydrates (17.1%), but also included γ-terpinene (14.1%), p-cymene (3.0%), thymol (10.0%) and carvacrol (3.7%). In contrast, the major volatile compounds found in *Origanum vulgare L* were thymol (21.5%), γ-terpinene (20.3%), p-cymene (21.0%) and carvacrol (4.3%). The esential oil content of the cultivars in this study ranged from 2.1 – 2.8%.

Bacterial Communities

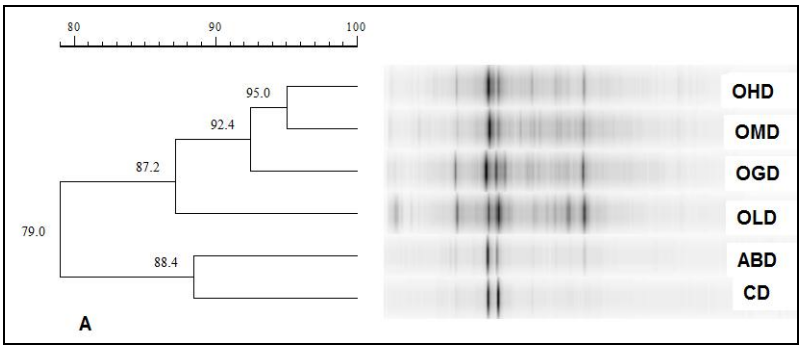
Dendrograms resulting from amplicon profiles of duodenal, jejunal, ileal, cecal and colonic bacterial community DNA revealed two main clusters, OEO-treated broilers and non-treated control broilers, in each intestinal segment (Fig. 1) ($P < 0.01$). These results indicated that all treatments with OEO had effect over microbial communities.

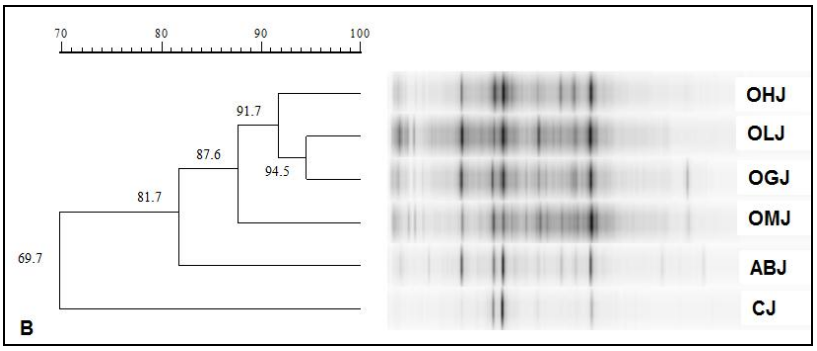
Table 2. Main component of different oregano essential oil chemiotypes

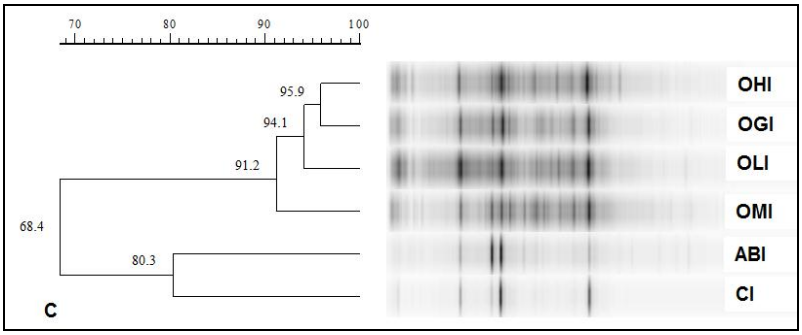
Component	Relative amount, %			
	OH*.	OM*	OL*	OG
Sabinene	0.6	4.3	0.4	---
β-myrcene	0.1	2.4	4.1	2.1
α –terpinene	0.1	5.2	5.9	1.8
p- cimene	---	3.0	21.09	19.0
γ-terpinene	15.5	14.0	20.3	5.0
Cis-sabinenehydrate	---	2.6	0.3	0.4
Trans-sabinenehydrate	0.5	14.5	0.4	0.3
Terpinen-4-ol	1.6	6.0	1.2	0.6
Carvacrol	21.7	3.7	4.3	50.8
Thyimol	4.7	10.0	21.5	7.7

*From commercial greenhouse crop located in the Sabana de Bogotá.

[1]OH = *O. vulgare L* ssp. *hirtum* (low carvacrol), OL = *O.vulgare*L (high thymol), OM = *O. majorana* (low carvacrol and thymol), and OG = *O. vulgare L.* ssp. *hirtum* (high carvacrol)


80
90
100
95.0
92.4
87.2
79.0
88.4
OHD
OMD
OGD
OLD
ABD
CD
A


70
80
90
100
91.7
87.6
94.5
81.7
69.7
OHJ
OLJ
OGJ
OMJ
ABJ
CJ
B


70
80
90
100
95.9
94.1
91.2
68.4
80.3
OHI
OGI
OLI
OMI
ABI
CI
C

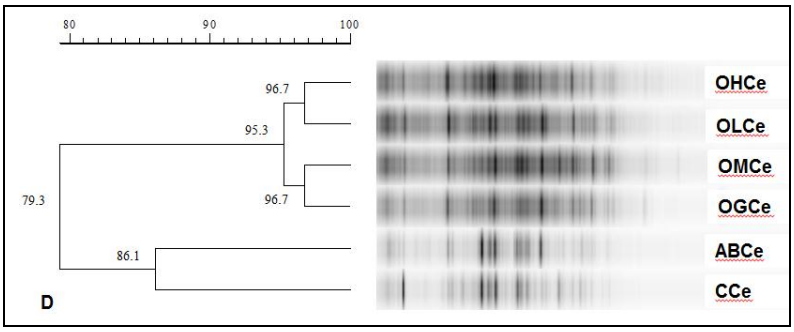

80
90
100
96.7
95.3
79.3
96.7
86.1
OHCe
OLCe
OMCe
OGCe
ABCe
CCe
D

Fig. 1. Dendograms of intestinal community of Duodenum (A), Jejunum (B), Ileum (C) and Cecum (D) of broiler chicken feed OEO. OH = *O. vulgare L.* ssp. *hirtum* (low carvacrol), OL = *O.vulgare L* (High thymol), OM = *O. majorana* (low carvacrol and thymol) and OG = *O. vulgare L.* ssp.*hirtum* (High carvacrol), AB = chlortetracicline and C = control, no additives.

Comparison of bacterial DNA profiles from different gut compartments revealed two principal clusters, foregut (duodenum, jejunum and ileum) and hind gut (cecum and colon) at the two periods evaluated (Table 3). Duodenum-jejunum-ileum presented a major SC (78.7%) compared to the lower SC observed between the two clusters (foregut vs hindgut) 57.8% SC ($P < 0.001$). Significant interaction between OEO and gut clusters ($P < 0.01$) would be explained, because the treated groups with OEO showed the higher similarity (91.5% SC) between cecum – colon versus the control groups AB and C (68.5% SC). Moreover, while SC between duodenum, jejunum and ileum augmented with days of age in OEO treated broilers, in non-OEO groups was reduced. When foregut and hindgut are compared, OEO treated groups presented the highest SC in growth period respect to start period, in contrast, non-OEO treated groups had a SC similar in both periods.

Production Parameters

The OM, AB and C groups presented the higher body weight at 21 d, 778 ± 12.6 g, 779 ± 12.1 g, and 770 ± 9.1 g, respectively, compared to 739 ± 10.2 g, 724 ± 8.3 g, for OH and OG, respectively ($P < 0.05$) (Table 4). The OEO and antibiotic supplemented groups presented the lowest ascites mortality when they were compared with C groups (5.4% versus 13.3%). No differences were observed between treatments for feed conversion ratio and body weight at 42 days of age (Table 4).

Table 3. Similarity coefficients (%) from foregut and hindgut dendrogram clusters of microbial communities among oregano essential oil-treated and non-treated broiler chickens.

Clusters	Period	DJI[3]	CeCo	DJI vs CeCo
OEO[1]	Starter	73 ± 2.3[2]	88 ± 7.3	53 ± 3.9
	Grower	83 ± 4.2	95 ± 8.4	65 ± 6.4
Non-OEO	Starter	84 ± 5.3	61 ± 1.0	57 ± 6.9
	Grower	75 ± 4.4	76 ± 1.9	58 ± 6.9

Effects	OEO	Period	Gut	OEO*G	OEO*P	OEO * P * G
P-value	0.0086	0.0445	0.0001	0.0015	0.2570	0.3271

[1]OEO = Cluster chickens treated with oregano essential oils: OM, OL, OH and OG (n=12)
Cluster chicken non-treated with oregano essential oils: C and AB (n=6)

[2]Mean ± SE of similarity coefficients (SC).

[3] Gut: SC between duodenum, jejunum and ileum (DJI), SC between cecum and colon (CeCo) and SC between DJI and CeCo (DJI vs CeCo).

Periods: Start (21d) and Growth (42d), according to feed faces.

DISCUSSION

Oregano Essential Oil Composition

Some of studies on oregano were conducted to identify essential oil composition (Baydar et al. 2004). This study confirmed that subspecies *O. vulgare L.* ssp. *hirtum* is richer in carvacrol than thymol as it has been reported by other researchers (Baser et al., 1994; Kokkini and Vokou, 1989; Kokkini, 1997). The subspecies *hirtum* is widely used as a spice under the name ‘Greek oregano’ and it is a type of oregano considered to have the highest quality in the market. The essential oil composition of this subspecies, however, was not homogenous.

Table. 4 Production parameters of broilers fed oregano essential oils

Body weight, g							
Day	OH[1]	OL	OM	OG	AB	C	P-value
7	131[b]	141[ab]	143[a]	135[ab]	138[ab]	140[ab]	0.0416
21	739[b]	770[ab]	778[a]	724[b]	779[a]	770[a]	0.0314
42	2,359	2,443	2,453	2,385	2,390	2,394	0.9038
Feed intake, g							
1-42d	3,595	3,830	3,764	3,747	3,772	3,790	0.5949
Feed conversion ratio (Feed intake: total weight gain)							
1-42 d	1.56	1.60	1.56	1.60	1.61	1.62	0.8489
Mortality, %							
1-42d	5.5[b]	2.2[b]	6.7[b]	8.3[b]	4.4[b]	13.3[a]	0.001*

[1]OH = *O. vulgare L* ssp. *hirtum* (low carvacrol), OL = *O.vulgare*L (high thymol), OM = *O. majorana* (low carvacrol and thymol), and OG = *O. vulgare L.* ssp. *hirtum* (high carvacrol), AB = chlortetracicline, and C = control no additives.

*: P value, Chi square.

Commercial cultivars of oregano would be improved in their biological and economic values and their essential oil composition facilities identification of subspecies suitable for cultivation in a particular microregion. In this sense, oregano cultivated at high altitude (Sabana de Bogotá) showed a high content of precursors and low carvacrol compared with oregano cultivated in Greece that it showed a high content of carvacrol. It is known that the regulation of essential oil production and synthesis of metabolites is integrated into the plant physiology and depends on the metabolic state and its adaptation to the ecosystem (Sangwan et al., 2001). In a general context, two types of oregano are recognized in the *Origanum* genus and its related species: Native Mediterranean oregano and *Lippia*, identified as a genus restricted to tropical and subtropical America (Olivier, 1996). Based on the composition of essential oils at the genus level, *Origanum* can be divided into three intraspecific chemotypes: type carvacrol, type thymol and type terpinen-4-ol (Skoula et al., 2002). This current study evaluated the three chemotypes, *O. vulgare L. ssp. hirtum* with a high proportion of carvacrol, *O. vulgare* L. with high thymol proportion and *O. majorana* with a high content of compounds derived from sabiene. Reports in the

literature reveal that *O. vulgare L*. ssp. *hirtum* is most commonly carvacrol-rich and less commonly thymol-rich (Baser et al., 1994; Kokkini and Vokou, 1989; Kokkini, 1997). It is considered that an OEO would contain at least 55% carvacrol + thymol and the carvacrol: thymol ratio would be over 10 (Nitsas, 2000). Although these two metabolites have antioxidant and antibacterial effects, carvacrol has received more attention by different research groups.

The chemotypes evaluated in this study showed a high content of precursors, *p*-cymene and γ-terpinene, when compared with the *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* oil from oregano cultivated in Greece. These differences would be related to agro-ecological factors and culture conditions related to each cultivar. In this study the *O. majorana* essential oil showed a similar composition to a Tujan Oregano Group studied by Skoula et al. (2002), where cis- and trans-sabinene, and γ-terpinene exhibited a major concentration while p-cymene, thymol, and carvacrol were less abundant. These compounds are together referred as "sabinil compounds", while carvacrol and thymol and their precursors are referred as “cimil compounds”. The essential oils from *O. vulgare L.* and *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* showed the highest levels of cimil compounds. When a plant presents the sabinilo compounds, usually the cimil compounds are in a lower concentration (Baser et al., 1994). Many *Origanum* species are rich in sabinil compounds, for example *O. majorana*, but the richest in cimil compounds are O*. vulgare L* and *O. vulgare H*., but never both at once. It has been suggested that when the cimil pathway is activated in *Origanum* spp., the sabinil metabolic route is repressed, but not completely absent (Skoula et al., 2002).

Intestinal Microbial Community

Broiler chick diet supplementation with oregano essential oils resulted in microbial community changes in the different intestinal tract segments. Different studies report effects of essential oils on changes in the composition of intestinal microflora. Hume et al. (2006) showed by DGGE a modulating effect of the intestinal microbial community of chickens challenged with coccidia and avoiding drastic changes in the microbial community after infection with coccidia by using a commercial mixture of essential oils. Jamroz et al. (2003) showed a reduction of *E. coli* and *C. perfringens* CFU in rectal contents of broilers treated with mix capsaicin, carvacrol and cinnamaldehyde. However,

there are no known reports on the implementation of DGGE to monitor the effect of different chemotypes of OEO on microbial populations of the GIT of broilers. Differences in gut microbial community have been associated to the productive parameters. Torok et al. (2008) showed also differences related to diet on the composition of microbial community in the ileum and cecum. Those researches established a correlation between the differences in ileum microbial community composition and cecum with respect to the better performance measured as the apparent metabolizable energy.

Consistent differences were observed between the fractions of foregut and hindgut bacteria communities. An effect was found for OEO diet supplementation on the reduction of microbiological profile differences between cecum and colon populations in broilers and augment of SC between and within duodenum, jejunum e ileum vs cecum and colon from starter to grower period. Each compartment of the gut develops its own microbial community as the broiler ages (Amit-Romach et al., 2004). Lu et al. (2003) found the composition of ileal and cecal libraries did not differ when the birds were 3 days of age and during the first 14 days of age, the cecal microflora was a subset of the ileal microflora. After this time, the composition of the ileum and cecum microbial gene libraries differed significantly. Furthermore, Hume et al. (2003) suggested that a microbial composition similarity between gut compartments is expected, and as the distance between sections increases, the differences between microbial compositions become larger. Bjerrum et al. (2006) found similar results and a greater microbial diversity in the cecum than ileum. Knarreborg et al. (2002) also demonstrated, by using DGGE profiles that the composition of the gut microbiota in broilers was dependent on age and also it was influenced by the diet and antibiotic supplementation. Similar results were observed in the present study; OEO supplementation influenced the microbial community. Unlike conventional techniques, molecular techniques such as DGGE, designed to study microbial ecology of complex communities (Muyzer and Smalla, 1998), allows detection of changes in intestinal microbiota by the effect of feed additives in the diet (Rehman et al., 2008; Hume et al., 2003; Oviedo-Rondón et al., 2006; Pedroso et al., 2005; Rehman et al., 2008).

The current study applied DGGE as the molecular approach to monitor the intestinal microbiota in broiler chickens fed with different chemotypes of OEO. Despite limitations of DGGE reported by Hume et al. (2006), the results of this study suggested

that this technique was useful to evaluate changes in the microbial community as a result of diet with OEO. However, is not clear at the present which was the ideal bacterial composition to promote broiler health and production or that it can fight against different diseases. An important effect observed in this study was a low bacterial community change between the foregut (duodenum, jejunum and ileum) and hindgut (cecum and colon) of broiler chickens of OEO supplemented group compared with control groups, AB and C.

On the other hand, the mortality caused by ascites was exacerbated in this study, possibly because the broiler chickens were kept at 2,650 meters above sea level. Different studies indicate that altitude and cold conditions are factors that trigger this pathophysiological syndrome (Hernández, 1987; Shlosberg et al., 1996; Özkan et al., 2010). However, the OEO and antibiotic additives were successful in reducing mortality from ascites. Similar results were found by Solis de los Santos et al. (2005), who showed that the addition of a prebiotic in the diet of chickens reduced ascites mortality. The authors suggested that this finding was due to stimulation of maturation and increased efficiency of the gastrointestinal tract.

Improvement and cultivation of superior oregano cultivars are the vital importance for designing and formulating functional additives to the poultry industry. Knowledge of chemical composition gives the opportunity to select different chemotypes cultivars of oregano essential oils for different segments of the industry and niches of production in an integrative approach. This study represents the first work that evaluates three main chemotypes of *Origanum* in broiler diets under high altitude and cold conditions. It was found that those chemotypes characterized in commercial conditions in Sabana de Bogotá were a high concentration of carvacrol and thymol precursors and a low content of carvacrol and thymol. When these OEO were included in a commercial cycle of broiler production, they decreased differences in the microbial community profiles between the foregut and hindgut. The OEO and antibiotic promoter inclusion in a feeding system of broiler chickens significantly reduced mortality from ascites syndrome (-7.9%). In summary, results suggest positive effects of locally commercial cultivated *Origanum* essential oils on broiler production at high altitude.

REFERENCES

Aligiannis, N., E. Kalpoutzakis, S. Mitaku, and I. B. Chinou. 2001. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 49:4168-4170.

Amit-Romach, E., D. Sklan, and Z. Uni. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Poult. Sci. 83:1093-2002.

Bakkali, F., S. Averbeck, C. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils – A Review. Food Chem. Toxicol. 46:446-475.

Baricevic, D., and T. Bartol. 2002. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus. Pages 177-201 in Oregano, The genera *Origanum* and *Lippia*.Spiridon E.K., ed. Taylor & Francis Inc, New York.

Baser, K. H. C., T. Ozek, M.Kirkcuoglu, and G.Tumen. 1994. The essential oil of *Origanumvulgare* subsp. *hirtum* of Turkish origin. J. Essent. Oil Res. 6:31-36.

Baydar H, Sag˘dic¸ O, O¨ zkan G, Karadog˘an T. 2004. Antibacterial activity and composition composition of essential oils from Origanum,Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Control 15:169–172.

Ben, A., S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard, and P. Chalier. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett. Appl. Microbiol. 43:149-154.

Bjerrum, L., R. M. Engberg, T. D. Leser, B. B. Jensen, K. Finster, and K. Pedersen. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture based techniques. Poult. Sci. 85:1151-1164.

Botsoglou, N. A., P. Florou-Paner, E. Christaki, D. J. Didry, N. L. Fletouris, and A. B. Spais. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. Br. Poult. Sci. 43:223- 230.

Denman, S. T., and C. S. McSweeney. 2005. Quantitative (real time) PCR. Pages 105-120 in Methods in Gut Microbial Ecology for Rumiants. FAO. IAEA. Ed Springer.

Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19: 4008.

Dorman, H. J. D., and S. D. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88:308-316.

Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N. A. Botsoglou, and A. B. Spais. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeriatenella*. Arch. Anim. Nutr. 57:99-106.

Guarner, F., and J. R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet. 361: 512-519.

Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86: 985–990.

Hammer, K.A., C.F. Carson, and T.V. Riley. 2004. Antifungal effects of *Melaleucaalternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans, Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 53: 1081-1085.

Helander, I. M., H. L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, and A. von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46: 3590-3595.

Hernández, A. 1987. Hypoxic ascites in broilers: a review of several studies done in Colombia. AvianDis. 31: 658-661.

Hernández, F., J. Madrid, V. García, J. Orengo, and M. D. Megía. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poult. Sci. 83: 169-174.

Hume, M. E., L. F. Kubena, T. S. Edrington, C. J. Donskey, R. W. Moore, S. C. Ricke, and D. J. Nisbet. 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. Poult. Sci. 82: 1100-1107.

Hume, M. E., S. Clemente-Hernández, and E. O. Oviedo-Rondón. 2006. Effects of feed additives and mixed *Eimeria* species infection on intestinal microbial ecology of broilers. Poult. Sci. 85: 2106-2111.

Jamroz, D., J. Orda, C. Kamel, A. Wiliczkiewicz, T. Wertelecki, and J. Skorupinska. 2003. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. J. Anim. Feed Sci. 12: 583-596.

Knarreborg, A., M. A. Simon, R. M. Engberg, B. B. Jensen, and G. W. Tannock. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5918-5924.

Kokkini, S., and D. Vokou. 1989. Carvacrol-rich plants in Greece. Flavour Fragance J. 4: 1-7.

Kokkini, S. 1997. Taxonomy, diversity, and distribution of *Origanum* species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy.Pages 2-11.

Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. Coote, and G. J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91: 453-462.

Lee, K.W., H. Everts, H. J. Kappert, K.-H.Yeom, and A. C. Beynen. 2003. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. J. Appl. Poult. Res. 12: 394-399.

Lu, J., U. Idris, D. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer, and M. D. Lee. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of maturing broiler chicken. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6816-6824.

McCracken, V. J., J. M. Simpson, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. 2001. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. J. Nutr. 131: 1862-1870.

Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial popultions by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.

Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73: 127-141.

Nitsas, F.A. 2000. Pharmaceutical composition containing herbal-based active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. United States Patent 6, 106, 838, 22 August 2000.

NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th Edition. The National Research Council, National Academy of Sciences, Washington DC.

Olivier, G.W. 1996. The world market of oregano.Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. 8-12 May. CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy.

Oviedo-Rondón, E.O., M. E. Hume, C. Hernández, and S. Clemente-Hernández. 2006. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. Poult. Sci. 85: 854-860.

Özkan, S., Ç. Takma, S. Yahav, B. Sögüt, L. Türkmut, H. Erturun, and A. Cahaner. 2010. The effects of feed restriction and ambient temperature on growth and ascites mortality of broilers reared at high altitude. Poult. Sci. 89: 974-985.

Pakdel, A., P. Bijma, B. J. Ducro, and H. Bovenhuis. 2005. Selection strategies for body weight and reduced ascites susceptibility in broilers. Poult. Sci. 84: 528-535.

Pedroso, A. A., J. F. M. Menten, and M. R. Lambaist. 2005. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. J. Appl. Poult. Res. 14: 232-237.

Rehman, H., P. Hellweg, D. Taras, and J. Zentek. 2008. Effects of dietary inulin on the intestinal short chain fatty acids and microbial ecology in broiler chickens as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. Poult. Sci. 87: 783-789.

Sangwan, N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabih, and R. S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation 34: 3-21.

SAS Procedures Guide (Version 9). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2002. Tannock GW. Studies.

Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman, and R. M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 232-236.

Shlosberg, A., M. Bellaiche, G. Zeitlin, M. Yaacobi, and A. Cahander. 1996. Hematocrit values and mortality from ascites in cold-stressed broilers from parents selected by hematocrit. Poult. Sci. 75:1-5.

Skoula, M., and J. Harborne. 2002. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. Pages 127-150.In Oregano.Spiridon E.K., ed. Taylor & Francis, London and New York.

Solis de los Santos, F.; M. B Farnell; G. Téllez; J. M. Balog; N.B. Anthony, A. Torres-Rodriguez; S. Higgins; B.M. Hargis and A M Donoghue. 2005. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidente of broilers reared in a hypoxic environment. Poult. Sci. 84: 1092-1100.

Torok, V., A. K. Ophel-Keller, M. Loo, and R. J. Hughes. 2008. Application of Methods for Identifying Broiler Chicken Gut Bacterial Species Linked with Increased Energy Metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 74: 783-791.

Vazquez, R .S., and N. T. Dunford. 2005. Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J. Essent. Oil Res. 17: 668-671.

Williams, P., and R. Losa. 2002. Blending essential oils for poultry. Feed Mix. 10:8-9.

Wawer, C. and G. Muyzer. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. Appl. Environ. Microbiol.61:2203-2210.

Zhou, H., H. Zhou, J. Gong, J. T. Brisbin, H. Yu, B. Sanei, P. Sabour, and S. Sharif. 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. Poult. Sci. 86: 2541-2549.

CAPITULO 5

Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides* kunth en pollos de engorde

Liliana Betancourt L[1,3], MSc., Caudia Ariza N.[3], Ph.D., Gonzalo Díaz G. [1], Ph.D. y Germán Afanador T. [1], Ph.D.

[1]Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, [2]CORPOICA, Bogotá, Colombia, [3]Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

Artículo enviado a la revista MVZ, Córdoba.

Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides* kunth en pollos de engorde

Effects of different levels of essential oils from *Lippia origanoides* kunth in broiler chicken

Liliana Betancourt L, MSc, Claudia Ariza N, PhD, Gonzalo Díaz G, PhD y Germán Afanador T, PhD.

RESUMEN

Objetivo. Determinar el nivel de inclusión de aceite esencial de *Lippia origanoides* Kunth (AEO) que maximice el peso corporal y la eficiencia económica de la producción de carne de pollo. **Materiales y métodos.** Los AEO se obtuvieron por hidrodestilación y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas. Se evaluaron cuatro niveles de inclusión en las dietas: 0, 100, 200 y 300 ppm de AEO en dos grupos de machos de pollos de engorde, no retados y retados con ooquistes vacunales de coccidia. El nivel óptimo de inclusión de los AEO fue estimado mediante una función sinusoidal. **Resultados.** La suplementación con AEO produjo un efecto diferente sobre el peso corporal y la conversión de alimento en pollos retados y no retados (*P<0.05*). El nivel de AEO que maximizó el peso corporal en los grupos de pollos no retados fue de 65 ppm; mientras que para los grupos retados fue 147 ppm. La suplementación con AEO redujo el porcentaje de pollos con menos de 100 g en primera semana (P<0.05) y aumentó el ingreso neto parcial en un ciclo de producción de 35 días de edad. La suplementación con más de 200 ppm produjo un efecto deletéreo sobre el comportamiento productivo de los pollos de engorde. **Conclusiones**. Este es el primer estudio que reporta diferentes niveles de inclusión de un aceite esencial de *Lippia origanoides* tipo timol en un modelo de reto en pollos de engorde. Los AEO evaluados en este estudio constituyen una oportunidad y una alternativa económicamente viable para la producción de un aditivo nutracéutico para la industria de la producción de carne de pollo.

Palabras clave: aceites esenciales, *Eimeria*, pollos, timol.

ABSTRACT

Objetive. Determine the inclusion level of essential oil from *Lippia origanoides* kunth (OEO) that maximizes the body weight and economic efficiency of broiler meet production. **Materials and methods**. The OEO were obtained by hydro distillation and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometer. Four levels, 0, 100, 200 and 300 ppm of OEO were evaluated on two broilers groups, challenge with coccidia attenuated oocysts and non-challenge. The optimal inclusion level was estimated by a sinusoidal function. **Results.** The supplementation with 100 ppm of OEO reduced the negative impact of coccidia challenge on body weight, with 1.799, 1.889 and 1.995 g in Challenge without OEO, Challenge + OEO and control groups, respectively ($p<0.001$). A significant interaction was observed between AEO and challenge on body weight and feed conversion ($p<0.05$). The OEO level that maximized the body weight to non-challenge broiler chicken was 65 ppm; while to challenge groups was 147 ppm. **Conclusions**. This study is the first that evaluated different dietary inclusion levels of the essential oil from *Lippia origanoides* in feed to challenged and non-challenged broiler chickens. The OEO evaluated in this study are a economically viable alternative for the production of natural additive for broiler chicken meat industry.

Key Words: essential oils, *Eimeria*, broiler, thymol.

(Sources: http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe)

INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas representan un componente importante de la biodiversidad natural y contribuyen en muchas ecoregiones a la salud, la economía y el bienestar de las comunidades rurales. Particularmente, *Lippia origanoides*, es un componente importante de la biodiversidad en Colombia, se encuentra ampliamente distribuido y es dominante en suelos con baja disponibilidad de agua (1) como es la microrregión del Alto Patía, habitada por una población marginada y deprimida económica y socialmente.

Los aceites esenciales son compuestos volátiles de plantas medicinales y se han propuesto como una alternativa natural al uso de antibióticos en la dieta de los animales (2). Tal vez la más importante característica de estos derivados de plantas medicinales es que son seguros, por lo que se les denomina como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), por la FDA de Estados Unidos (3). Los aceites esenciales de orégano (AEO) se caracterizan por su contenido de carvacrol, timol y sus precursores el *γ*-terpineno y el *p*-cimeno, o por sabineno, cis- y trans-hidrato de sabineno y sus derivados (4). Los AEO presentan múltiples efectos funcionales: antiparasitario, antibacterial, antimicótico, estimulante de enzimas digestivas, atribuyendo esta actividad a los componentes mayoritarios: carvacrol y timol (5). En este sentido, a nivel mundial es aceptado que el orégano griego tiene las mejores calidades del aceite esencial, por su riqueza en carvacrol, siendo utilizado como aditivo en nutrición animal y en la preservación de alimentos contra la contaminación bacteriana (6, 7).

El género *Lippia* (familia Verbenaceae) presenta la mayor variedad de plantas en América tropical y subtropical e incluye aproximadamente 200 especies. Una característica del género es la diferencia observada en la composición de aceites esenciales reportada para la misma especie, en diferentes nichos geográficos. Mientras el género *Origanum* se cultiva en el mediterráneo, el género *Lippia* predomina y es cosechado de plantas silvestres en América Latina (8). A pesar de que *Lippia* es un género adaptado a las condiciones tropicales y algunos nichos producen aceites esenciales con alto contenido de timol y bajo nivel de precursores, no se ha evaluado su actividad biológica y menos su inclusión en sistemas de alimentación para pollos de engorde.

De otra parte, en estudios previos dentro del grupo de investigación y en otros reportados en la literatura (9) no ha sido posible alcanzar resultados consistentes tanto con el uso de AEO, como de antibióticos en sistemas de alimentación de pollos de engorde (resultados productivos no significativos respecto al control). En consecuencia, no hay un consenso sobre los niveles de inclusión de AEO, se reporta desde 50 ppm (9) hasta 300 ppm (10). Se sugiere que este amplio rango de inclusión es debido a las condiciones de higiene de los experimentos y a los diferentes vehículos utilizados para los AEO. En este sentido, para simular las condiciones comerciales de producción,

diferentes investigadores han evaluado los AEO con un desafío como la inoculación con ooquistes de coccidia de origen vacunal o infeccioso (11, 10).

La industria ha centrado su atención en AEO ricos en carvacrol para utilizarlos como aditivo nutracéutico, pero no se han realizado estudios que evalúen el efecto de los AEO ricos en timol y sus niveles de inclusión en sistemas de alimentación de pollos de engorde. El presente estudio se planteó para determinar el nivel óptimo de inclusión de aceite esencial *de L. origanoides* kunth que maximice el comportamiento de pollo de engorde cuando son inoculados con ooquistes atenuados de coccidia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y análisis de aceites esenciales. El material vegetal se obtuvo de la microrregión del Alto Patía y se llevó para su clasificación a la unidad de taxonomía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. La extracción del aceite esencial se hizo por el método de hidrodestilación en un equipo tipo clevenger durante 3 horas. Los aceites esenciales se enviaron para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de identificar los metabolitos secundarios y componentes principales de los AEO.

Alojamiento y tratamientos. Un total de 1.440 pollos de engorde machos de la estirpe Ross 308 de un día de edad fueron distribuidos aleatoriamente en 48 corrales en piso (30 pollos por corral) con cama nueva de viruta de madera. El sistema de calefacción a gas, 23 horas luz durante la primera semana, 18 horas durante la segunda semana y a partir de la tercera semana 12 horas luz. Se mantuvo un sistema de bebederos de campana. Los pollos se alimentaron a voluntad con dietas formuladas por fases (12) durante un ciclo de producción de 35 días (Tabla 1). Se evaluaron ocho tratamientos en un esquema factorial compuesto por dos factores, el efecto de 4 niveles de inclusión de AEO, 0, 100, 200 y 300 ppm y el reto con ooquistes atenuados de coccidia y no retados. A los 16 días de edad se aplicó doble dosis de vacuna contra coccidia que contenía 9 x 10^3 ooquistes/mL con *E. máxima*, *E. tenella*, *E. acevulina* y *E.*

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales

Ingrediente g kg^{-1}	**Pre-iniciación**	**Iniciación**	**Crecimiento**
Maíz	539,1	566,5	621,8
Torta de soya, 49	277,1	254,0	203,2
Soya integral	100,0	100,0	105,0
Aceite de palma	17,9	21,7	18,8
H. de pescado	20,0	15,0	10,0
Fosfato dicálcico	14,3	13,6	12,0
Carbonato calcio	12,2	11,7	10,9
Premezcla vit,min	2,0	2,0	2,0
Sal	3,5	3,5	3,5
Bicarbonato de Na	3,0	3,0	3,0
L-Lisina HCl	1,9	1,2	1,0
DL- Metionina	2,1	1,5	1,5
L-Treonina	1,1	0,3	0,3
Cl Colina 60%	1,0	1,0	1,0
Composición Calculada, %			
Proteína	22,61	21,14	19,4
E.M, kcal/g	3,000	3,050	3,100
Extracto etéreo	6,67	6,95	6,50
Calcio,	0,96	0,90	0,82
Fósforo total	0,80	0,76	0,64
Fósforo disp.	0,48	0,45	0,41
BDE, mEq/kg	257	247	224
Lisina digestible	1,28	1,15	1,07
Metionina digestible	0,53	0,45	0,44
Met+cis digestible	0,81	0,72	0,70
Treonina digestible	0,83	0,74	0,70

*Contenido por kg: Zinc 20.000 mg; Hierro: 8.400 mg; Manganeso: 35.000 mg; cobre: 1.700 mg; iodo: 430 mg; Selenio: 60 mg; vitamina A: 3.440.00UI; vitamina D3: 680.000UI; Vitamina E: 4.000UI; Colina: 172.000 mg; Niacina: 9.000 mg; Pantotenato de calcio: 3.060 mg; Vitamina B2: 1.430 mg; Vitamina B2: 1.430 mg; Vitamina K3: 856 mg; Vitamina B12: 4.6 mg.

BDE: Balance dietario de electrolitos

necatrix a 6,3, 1,5, 0,7 y 0,7 x 10^3 ooquistes viables/mL, respectivamente. Los pollos se distribuyeron en los 8 tratamientos.

Información recolectada. Se registró el consumo de alimento, el peso corporal, la mortalidad y se derivó la ganancia de peso corporal y la conversión alimenticia. Los primeros 7 días de vida se hizo una selección por peso corporal, aquellos pollos que presentaron menos de 100 g de peso, fueron sustraídos y descartados de los grupos experimentales. Al sacrifico, los pollos se fraccionaron y se determinó el rendimiento en canal y la deposición de grasa abdominal. Con los resultados de las anteriores variables se evaluó la eficiencia económica con base en la técnica de presupuestos parciales basada en los costos e ingresos por grupo experimental y tratamiento, respectivamente.

Para evaluar los efectos de la suplementación de AEO sobre la factibilidad técnica y económica de su uso en un sistema de producción comercial de pollo de engorde se utilizó la técnica de presupuestos parciales basado en los costos e ingresos por tratamiento o grupo experimental. Para estimar el costo por kilogramo de pollo en pie por tratamiento se utilizó el modelo descrito por Marini (13).

$$C= (B/X)+ c (Yi)$$

Dónde:

C = Costo por kg de pollo en pie en pesos, $

B = Costo del ave de un día, $

X = Peso corporal del pollo a los 35 días de edad

Y = Conversión de alimento

c = Costo del alimento a los 35 días de edad

i = Tratamiento experimental

Finalmente se calculó el ingreso neto parcial (INP) como la diferencia entre el valor de la producción (kg de pollo en canal * el valor comercial/kg de pollo) y el costo por concepto de alimentación (valor del kg de alimento * consumo de alimento).

Análisis estadístico. Los resultados se analizaron por ANOVA usando el procedimiento General Linear Models de SAS versión 9.0. (14) Para optimizar el nivel de inclusión en función del peso corporal, se corrió y evaluó un modelo sinusoidal, el cual permite establecer los niveles que maximizan y minimizan el peso corporal. La mortalidad y los descartes fueron evaluadas mediante pruebas de Chi Cuadrado, comparando los grupos suplementados con AEO respecto a los no suplementados. Se hicieron análisis estadísticos descriptivos con el fin de estimar los promedios y error estándar en cada tratamiento y variables analizadas.

RESULTADOS

El presente estudio se constituye en el primer experimento sobre la evaluación de un AEO nativo de Colombia, rico en timol, el cual permitió determinar un nivel óptimo de inclusión en un sistema alimentación para pollos de engorde.

Composición de AEO. El material vegetal fue clasificado como *Lippia origanoides* Kunth y en su composición predominó el timol con 78,7% y los precursores, el *p*-cimeno con 6,6% y el γ-terpineno con 2,7%, con un contenido muy bajo en carvacrol de 0,9%.

Comportamiento productivo de pollos de engorde. El peso corporal de los pollos de engorde sometidos a diferentes niveles de inclusión de AEO y un reto con ooquistes atenuados de coccidia se presenta en la tabla 2. Se observa que el desafío con ooquistes atenuados de coccidia redujo significativamente el peso corporal en todos los grupos experimentales el cual se expresó en mayor magnitud al final del ciclo de producción ($p<0.001$) con pesos de 1.799, 1.889 y 1.955 g, para pollos retados sin AEO, retados más 100 ppm de AEO y no retados ni suplementados, respectivamente.

Se encontró una respuesta diferencial a la suplementación con AEO en pollos de engorde inoculados con ooquistes atenuados de coccidia comparados con los no inoculados, porque la interacción entre estos dos factores evaluados fue significativa ($p< 0.001$).

Tabla 2. Efecto de diferentes niveles de inclusión de AEO (ppm) en la dieta de pollos de engorde retados con ooquistes de cooccidia sobre el peso corporal (g).

Día	**Retados**				**No Retados**			
	0	100	200	300	0	100	200	300
7	149	153	149	148	149	153	149	148
21	764	775	772	776	756	794	768	763
35	1799	1889	1858	1838	1955	1967	1875	1888
Valor P	1d	21d	35d					
Reto		0,8000	0,0001					
AEO	0,9405	0,0016	0,0002					
R*AEO		0,0400	0,0002					

La respuesta a los niveles de inclusión de AEO en cada grupo experimental (retados y no retados) fue estimada por la función sinusoidal. La función que estima los parámetros que son factibles de ser usados para interpretar la respuesta biológica en términos de peso corporal en pollos de engorde retados y con suplementación de AEO es de la forma: Y = 623.00 + 1.257.96*cos (0,0021X – 0,35) (R^2: 0,68). Donde Y es el peso corporal y X es el nivel de inclusión de AEO. En este caso la máxima respuesta en peso corporal a los 35 días se estimó en 1.880 g a una concentración de AEO de 147 ppm para pollos de engorde retados con ooquistes atenuados de coccidia. Este tipo de función aplicada al grupo de pollos de engorde no retados mostró un nivel óptimo de inclusión de AEO de 65 ppm para un peso máximo de 1,982 g. Por el contrario, el valor mínimo de peso corporal estimado fue con una inclusión de 233 ppm y un peso corporal de 1.860 g. La función ajustada a la respuesta descrita para este grupo fue:
Y = 1.921,44 + 61,02 *cos (0,017X - 0,99) (R^2:0,78).

En la tabla 3 se presenta la conversión de alimento (g:g) para los pollos de engorde retados y no retados con la inclusión de distintos niveles de AEO. Se encontró un efecto positivo de la inclusión de 100 ppm de AEO sobre la conversión de alimento (*p<0.001*) para grupos de pollos retados y no retados. Sin embargo, a los 21 días de edad, hubo una respuesta más clara en los pollos de engorde no restados, pero a los 35

días, la suplementación con 100 ppm ade AEO mejoró más la conversión de los pollos de engorde retados; la interacción fue significativa tanto a los 21 como a los 35 días de edad (*p<0.05*).

Tabla 3. Efecto de diferentes niveles de inclusión de AEO (ppm) en la dieta de pollos de engorde sobre la conversión acumulada de alimento:

Periodo	**Retados**				**No Retados**			
	0	100	200	300	0	100	200	300
21 d	1,34	1,30	1,35	1,31	1,39	1,27	1,35	1,35
35 d	1,67	1,57	1,61	1,62	1,61	1,56	1,64	1,62

Valor P	21d	35d
Reto	0,1419	0,3003
AEO	0,0001	0,0001
R*AEO	0,0078	0,0250

Rendimiento en canal y análisis económico. En la tabla 4 se presentan los promedios obtenidos para las fracciones de la canal y parámetros de impacto económico. El porcentaje de mortalidad presentó un comportamiento diferente, en los pollos retados la inclusión de AEO incrementó el porcentaje de mortalidad (p<0.05), mientras que en los pollos de engorde no retados, la inclusión de 100 ppm de AEO redujo el porcentaje de mortalidad (p<0.05), pero la inclusión de 200 y 300 ppm de AEO no produjo diferencias significativas en la mortalidad respecto al grupo control, resaltando que la causa de mortalidad encontrada fue por ascitis, debido a la presencia de plasma en la cavidad torácico-abdominal. La adición de AEO en el alimento redujo significativamente el porcentaje de descartes (*p<0.05*), con un total de 8.3% de pollos inferiores a 100 g de peso corporal en primera semana para el grupo control, respecto a 2.9% en pollos de engorde suplementados con AEO. Se observó un efecto significativo del reto sobre la deposición de grasa abdominal, con 2.5% para pollos retados y 2.1% para pollos de engorde no retados (*p<0.05*). La suplementación con AEO no afectó la proporción de pierna-pernil y rendimiento en canal. Sin embargo, los kg de pollo, pechuga y pierna-pernil fueron afectados positivamente por la inclusión de AEO (*p<0.05*).

La inclusión de AEO en el alimento afectó el INP (*p<0.01*), se determinó la función sinusoidal de la forma Y = 184,997 + 16,2036*cos (2,1978X-4,0239) en, donde Y es INP en miles de pesos y X el nivel de inclusión de AEO en ppm. A partir de esta función se estimó que el máximo INP fue de $201.200 (US$112.9) con un nivel de inclusión de 166 ppm de AEO. Para este parámetro no se encontró interacción entre los dos factores evaluados.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se establecieron dosis diferenciales de AEO para un sistema de alimentación de pollos de engorde bajo condiciones experimentales de reto con ooquistes atenuados de coccidia y sin reto, simulando las condiciones comerciales, donde se encuentran mayores densidades de población y una carga mayor microbiológica y de parásitos. Este estudio también se constituye en la primera evidencia experimental de niveles diferenciales de inclusión de AEO en condiciones menos higiénicas de producción (reto con coccidia) y en condiciones experimentales más “limpias”.

El efecto del reto tuvo impacto negativo sobre el peso corporal a los 35 días de edad, cuando se sacrificaron los pollos de engorde. Con la inclusión de AEO se logró atenuar este efecto negativo sobre el peso corporal por la inoculación con ooquistes atenuados de coccidia. La evaluación de los diferentes niveles de inclusión de AEO y la interacción presentada entre la inclusión de AEO y el reto permitió establecer que se requiere niveles de inclusión de AEO más altos cuando hay un desafío con coccidia respecto a condiciones higiénicas favorables que se observa normalmente bajo condiciones experimentales (15). Los efectos negativos de la inoculación con ooquistes atenuados se observaron con mayor intensidad al final del ciclo de producción. Es posible que una proporción de ooquistes esporulados en el inóculo de vacuna viva hayan pasado través del tracto digestivo y se haya reingerido posterior a la vacunación e infectado posteriormente al pollo de engorde como lo señala Williams (16).

Tabla 4. Rendimiento en canal e ingreso neto parcial de pollos de engorde a los 35 días de edad alimentados con aceites esenciales de *Lippia origanoides* Kunth

Reto	Retados				No retados							
AEO ¶ ¶ Parámetro	0 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	0 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	Valor P OEO	Valor P Reto	Valor P OEO*¶ Reto	
Rend Canal, %	68,2	69,1	67,0	69,7	68,9	69,2	68,4	68,2	0,215	0,770	0,228	
Pechuga, %	34,3	34,5	33,5	34,8	34,5	35,3	35,0	34,1	0,681	0,276	0,274	
Pierna-pernil, %	30,4	28,9	28,6	29,0	30,1	30,2	29,2	30,7	0,132	0,065	0,349	
Grasa abdominal, %	2,4	2,7	2,7	2,3	2,3	2,3	2,0	2,1	0,444	0,035	0,673	
Mortalidad, %	1,2	3,5	3,3	2,4	3,2	1,3	5,0	1,7	0,422	0,844	0,417	
Descartes, %	5,1	1,5	2,5	1,3	5,1	1,5	2,5	1,3	0,621	0,681	0,414	
Kg de pollo	95,3	98,3	92,3	98,1	95,6	103,5	93,9	98,4	0,017	0,285	0,714	
Kg de pechuga	47,9	49,1	46,2	49,0	47,7	52,7	47,9	49,3	0,034	0,151	0,463	
Kg pierna-pernil	42,4	41,1	39,4	40,9	41,8	45,2	40,1	44,4	0,059	0,043	0,241	
Ingreso Neto Parcial, miles	176,6	186,0	163,9	178,6	182,9	202,3	165,6	179,5	0,002	0,375	0,595	

Se han planteado dos posibles mecanismos por los cuales los AEO pueden ser útiles en presencia de parásitos: las propiedades inmunomodulatorias y su efecto antiparasitario (17). Giannenas et al. (10) comprobaron un efecto anticoccidial de los AEO, al observar un menor número de: ooquistes, incidencia de lesiones, presencia de diarrea sanguinolenta y una mayor tasa de supervivencia de pollos de engorde retados con ooquistes infecciosos de *E. tenella* y suplementados con AEO, respecto al grupo control infectado sin suplementación con AEO. Sin embargo, en el mismo estudio, comprobaron que los AEO ejercen un efecto anticoccidial más bajo que el obtenido con el antibiótico ionoforo Lasalocid. En el presente estudio no se observó la presencia de diarrea sanguinolenta en ninguno de los tratamientos experimentales, posiblemente por la baja cantidad de ooquistes inoculados (9×10^3 ooquistes/mL), respecto al experimento de Giannenas et al. (10) (5×10^4 ooquistes/mL). En el presente estudio se utilizaron ooquistes atenuados de *E. máxima, E. tenella, E. acevulina* y *E. necatrix,* en contraste, en el estudio reportado por Giannenas se utilizaron ooquistes infecciosos de *E. tenella*. Adicionalmente, se reporta que las cepas atenuadas tienen un potencial reproductivo reducido, por lo tanto, no se esperan efectos patógenos severos como los obtenidos con cepas infecciosas de coccidia (16).

La conversión alimenticia también fue significativamente mejorada con la inclusión de 100 ppm de AEO en la dieta de los dos grupos experimentales, retados y no retados. Diferentes efectos funcionales se podrían asociar a una mejor eficiencia en la utilización del alimento, una mejor digestibilidad observada en previos experimentos de nuestro laboratorio y otros estudios (18) debido a la inclusión de AEO; como potenciador del sistema inmune (17), antiinflamatorio (19, 20) y analgésico mediados por un efecto inhibitorio de síntesis de prostaglandinas (21).

La eficiencia en el sistema de producción de carne de pollo, no solamente está determinada por la eficiencia en la utilización de alimento, es la conjugación de factores como la mortalidad, la morbilidad, el costo del alimento, la tasa de crecimiento y el rendimiento en canal, entre otros. El ingreso neto parcial muestra en parte una conjugación de todos estos parámetros y nos permite comparar el verdadero efecto de los tratamientos. En el presente estudio, se estimó que un nivel de 113 ppm de AEO permitiría maximizar el INP. Con niveles superiores a 200 ppm se observaron efectos

negativos por un aumento del costo de la suplementación y reducción de la tasa de crecimiento, dejando ver un posible efecto tóxico bajo estos niveles de inclusión. Efectos negativos y tóxicos de los AEO ya han sido reportados en otros estudios: Dušan et al. (22) encontraron una actividad citotóxica de los AEO sobre la línea de células de colon de humano, las Caco-2, utilizando dosis de 0,05% (alta) de un AEO rico en carvacrol (55%) encontraron que las células Caco-2 mostraron un incremento significativo en la mortalidad después de una hora (células necróticas 56,06%, apoptóticas 0,59%), comparadas con el control (células necróticas 7,15%, apoptóticas 0,02%, $p<0.001$). La actividad antibacterial del carvacrol y el timol se basa en su efecto desestabilizante sobre la membrana celular (23), pero al mismo tiempo, este efecto podría conducir a problemas secundarios en el ave si no se dosifica adecuadamente. Al respecto en mamíferos, Magyar et al. (24) demostraron en tejido cardiaco que el timol (100 µM) tiene un efecto supresor sobre la corriente cardiaca de iones y puede conducir a arritmias; similares resultados encontró Zsentandrassy (25) quien evaluó el efecto del timol y sus análogos sobre las propiedades electrofisiológicas de células de miocardio y músculo esquelético humano, canino y de rata. El autor determinó un efecto supresor dependiente de la concentración, de todas las corrientes iónicas, debido a una baja cantidad de calcio activo causado por un bloqueo de la corriente de calcio. Zsentandrassy concluyó que el timol puede causar arritmias cardiacas en caso de un elevado consumo (100 µM o más en tejido). El presente estudio se hizo a 2640 msnm donde se presenta una mayor predisposición a la hipertensión pulmonar; adicionalmente, el aceite esencial de *Lippia origanoides*, es rico en timol (78%). Esto podría explicar el porqué se encontró una mayor incidencia de mortalidad por ascitis en los grupos suplementados con 200 ppm, la cual está relacionada con una falla cardiaca congestiva e hipertrofia ventricular derecha, efecto no reportado en previos estudios.

Los aceites esenciales de *Lippia origanoides* procedentes del alto Patía, se constituyen en una alternativa económicamente viable para la producción de un aditivo nutracéutico para la industria de la producción de carne de pollo. Con base en todos los experimentos realizados al interior del grupo de investigación con AEO y los reportes en la literatura, se podría concluir que en la medida que se vehiculicen los AEO para una mayor solubilidad y se protejan (microencapsulados), los niveles de inclusión efectivos serán inferiores y menos nocivos. El presente estudio es el primero en reportar niveles

diferenciales de inclusión de AEO que optimizan el peso corporal de pollos de engorde para condiciones de un mayor desafío (ooquistes atenuados de coccidia) y condiciones experimentales más limpias.

Agradecimientos: Corpoica, Universidad de La Salle, Ministerio de Agricultura, por el apoyo económico y logístico. Yesid Avellaneda, Ronnal Ortiz, Leonardo Sánchez, Stella Rodríguez, Javier Sánchez, Daniel Rodríguez, por su apoyo en el trabajo de campo.

REFERENCIAS

1. Albesiano S, Rangel-Ch J y Cadena A. La vegetación del cañón del río Chicamocha (Santander, Colombia). Caldasia 2003; 25 (1): 73-99.

2. Williams P and R Losa. Blending essential oils for poultry. Feed Mix. 2002; 10 (3): 8-9.

3. Silva R, Vazquez N, Dunford T. Bioactive Components of Mexican Oregano Oil as Affected by Moisture and Plant maturity. J Essent Oil Res 2005; 17 (6): 668-671.

4. Baser KHC. The Turkish Origanum species. In: Spiridon E.K. Oregano. The Genera *Origanum* and *Lippia.* First ed. New York: Taylor & Francis Inc.; 2002. p. 109-126.

5. Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. Anim Feed Sci and Tech 2007; 134 (3): 304–315.

6. Ninkov D, inventor. Pharmaceutical composition suitable for use against Histomoniasis. U S patent 5990, 178. 2005.

7. Nitsas FA, inventor. Pharmaceutical composition containing herbal-based active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. US Patent 6, 106, 838. 2000 August 22.

8. Baricevic D and Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus. In: Spiridon E.K. Oregano. The Genera *Origanum* and *Lippia.* First ed. New York: Taylor & Francis Inc.; 2002. p. 177-201.

9. Botsoglou NA, Florou-Paner P, Christaki E, Didry DJ, Fletouris NL and Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. Br Poult Sci 2002; 43 (2): 223-230.

10. Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, and Spais AB. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Arch Anim Nutr 2003; 57 (2):99-106.

11. Oviedo-Rondón EO, Hume ME, Hernández C and Clemente-Hernández S. Intestinal Microbial Ecology of Broilers Vaccinated and Challenged with Mixed *Eimeria* Species, and Supplemented with Essential Oil Blends. Poult Sci 2006; 85 (5): 854-860.

12. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2. ed. Editora UFV, Viçosa; 2005: 186.

13. Marini PJ. Use of simulation programs to predict optimization points in the broiler cycle. En: Congreso Mundial de Avicultura. Río de Janeiro, Brasil; 1978. p. 170-172.

14. SAS Procedures Guide (Version 9). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2002. Tannock GW. Studies.

15. Lee KW, H Everts, HJ Kappert, M Frehner, R Losa and AC Beynen. Effect of dietary essential oils on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br Poult Sci 2003; 44 (3): 450–457.

16. Williams RB. Epidemiological aspects of use of live anticoccidial vaccines for chickens. Int J Parasitol 1998; 28 (7): 1089-1098.

17. Hernández F, J Madrid, V García, J Orengo and MD Megía. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poult Sci 2004; 83 (2): 169-174.

18. Anthony J-P, L Fyfe and H Smith. Plant active components – a resource antiparasitic agents?. Trends Parasitol 2005; 21 (10): 462-468.

19. Skold K, Twetman S, Hallgren A, Yucel-Lindberg T And Modeer T. Efect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. Eur J Oral Sci 1998; 106 (1): 571-575.

20. Yucel-Lindberg T, Twetman S, Skold-Larsson K And Modeer T. Efect of an antibacterial dental varnish on the levels of prostanoids, leukotriene B4, and interleukin-1 beta in gingival crevicular fluid. Acta Odontol Scand 1999; 57 (1): 23 - 27.

21. Süleyman A., Y. öztürk, R. Beis and K. Hüsnü. Investigation of *Origanum onites*, *Sidertis congesta* and *Satureja cuneifolia* Essential oils for analgesic activity. Phytotherapy Research 1996; 10: 342-344.

22. Dušan F, Sabol M, Katarína D, Dobroslava B. Essential oils—their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability. Toxicol *In Vitro* 2006; 20 (8): 1435–1445.

23. Ultee A, Bennik MHJ and Moezelaar R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus. Appl and Environ Microb 2002; 68 (4): 1561-1568.

24. Magyar J, Szentandrássy N, Bányász T, Fulöp L, Varró A, Násási PP. Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. Br. J. Pharmacol 2002; 136 (3): 330–338.

25. Zsentandrassy N. Effects of thymol on cardiac and skeletal muscle. PhD Thesis. Debrecen: University of Debrecen, Medical and Health Science Center. Medical School. 2003.

CAPITULO 6

Efecto de aceites esenciales de oregano (*Lippia origanoides* kunth) sobre la microbiota cecal del pollo de engorde por análisis metagenómico

Liliana Betancourt L*§, Michael Hume†, Fernando Rodríguez V‡, Scott Down†, Guillermo Torres*, Claudia Ariza N‡, Germán Afanador T*

*Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, †USDA, ARS, FFSRU, CollegeStation, TX, USA, ‡CORPOICA, Bogotá, Colombia, § Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

Escrito con normas para la revista Poultry Science.

Effects of oregano essential oils (*Lippia origanoides* Kunth) on broiler cecal microbiota by metagenomic analysis

ABSTRACT

The plant extracts can affect poultry health and production through its effect on gut microbiota. The objective of this study was evaluate the effect of *Lippia Origanoides* essential Oil (OEO) supplementation on broiler chicken cecum bacterial diversity by a 16S rRNA-based tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) method. Two OEO levels in feed, 0 (C) and 100 ppm (O), two groups of broiler chickens, challenged with ooquistes of coccidia vaccine at 2X (E) and unchallenged (U), and their interaction were evaluated. Based on beta diversity parameters it was found that OEO supplementation to E groups showed a better similarity percentage of cecum microbial community profile than C-E groups respect to control groups. Based on rarefaction curve, were estimate a total of 107,774 pyrosequence reads, 27,855, 29,021, 27,423 and 23,475 for C-U, O-U, C-E AND O-E groups, respectively, and a total of 51,224 operational taxonomic units (OTUs) observed with a 97% identity threshold sequences. The chicken cecal samples were consistent in that Firmicutes phylum and Clostridia class were highly prevalent. A differential effect of OEO on broiler chickens cecum bacterial community and composition was showed ($P < 0.05$). The OEO supplementation on challenged groups reduced the percentages of Estreptococcacea, *Faecalibacterium*, Pseudomononales, *Clostridium* and *Salmonella* bacterial groups. The OEO controlled *Enterobacter*, *Gemella* and *Pasteurella* gender in E and U groups. Pyirosequencing technic permitted us a better understanding of effect of OEO on broiler chickens cecum bacterial community and its composition.

Key words: Bacteria taxonomy, coccidia, Firmicutes, metagenomic, Salmonella, thymol.

INTRODUCTION

Gut microbiota has a strong influence on host metabolism and immunological activity with important consequences for health and growth of animals (Martínez et al., 2009). The presence of a commensal intestinal microbiota in young animals is critical for

numerous physiological processes including growth. Optimization of nutrition and stimulation of various branches of the innate and adaptive immune systems (Hooper, 2001, 2004) are alternatives for a better intestinal health. Gut lumen and mucosal surface of the intestines and cecum of broiler chickens are major sites for colonization by bacteria and other microbes (Lan et al., 2005). The focus has been to prevent and monitor pathogenic bacteria that are known for traditional methods of cultivation. With this purpose, the animal industry has used antibiotics in the feed for more than 50 years. But in recent years, the ban on use of antibiotics as feed additives has increased interest in search alternatives to replace the use of antibiotics in animal nutrition and has been the target search the role of microbial community on animal growth and health for achieving future sustainability and for improving the efficiency of poultry production (Amit-Romach et al., 2004; Pedroso et al., 2005). Gastro intestinal tract is a complex system, where the establishment of the dominant bacterial community is affected by dietary and host-related factors (Korver, 2006; Callaway et al., 2009). Studies that describe these relationships in poultry production are scare. In humans it has found dietary effects on host cholesterol metabolism, diabetes, are conferred, at least in part, through to an effect on the gut microbiota (Martínez et al., 2009; Roesch et al., 2007; Turnbaugh et al., 2008).

Is accepted that only a minimal fraction of the microorganisms that inhabit the digestive tract are known by the traditional cultured methods, which time consuming and cover about 1% of bacteria that habit in gastrointestinal tract (Nocker et al., 2007). Techniques that allow us to characterize microbial communities and identify an organism or gene in a complex environment such as the digestive tract for study the true effect of additives on the microbial community are necessary to apply. The studies of comparative metagenomics with specific dietary manipulations can disclose the niches of previously uncharacterized members of the gut microbiota (Turnbaugh et al., 2008).

The Genome Sequencer FLX System (GS FLX), powered by 454 Sequencing, is a next-generation DNA sequencing technology featuring a unique mix of long reads, exceptional accuracy, and ultra-high throughput (Droege and Hill, 2008). Pyrosequencing is used to monitoring relevant changes of bacterial communities in microbial ecosystem (Andersson et al., 2008). Pyrosequencing technology allows us to characterize microbial communities using 16S ribosomal RNA (rRNA) sequences orders of magnitude faster

than has previously been possible (Liu et al., 2007). Full-length 16S rRNA sequences offer the highest possible degree of taxonomic resolution using this gene, but limit our ability to survey the less-abundant members of this diverse community (Dethlefsen et al., 2008). The 454 sequencing technology has been used to achieve several of the recent breakthrough discoveries in metagenomics and microbial diversity research, because highly accurate, 250 bp reads provide the uniqueness required to unambiguously identify an organism or gene in an unknown complex environmental sample by mapping or assembly of single reads (Droege and Hill, 2008).

On the other hand, the phytochemicals have been proposed as natural sources of biologically important metabolites to be ideal feed additives to animal production (Yang et al., 2009). Within those phytobiotics, have been applied the oregano essential oils (OEO) into broiler chicken feed. The effects of essential oils on feed intake, digestive secretions, growth (Hernández et al., 2004) and cultivable pathogen (Jamroz et al., 2003) have been showed. However, the effect of OEO on microbial community by 454 sequencing technology has been little reported.

Essential oils of Greek oregano varieties (*Origanum* ssp), with high carvacrol content, have been proposed as the most effective for its antibacterial activity and have been the most studied. However, the OEO high thymol such as *Lippia* genus native from America tropical, have not been studied as feed additives for broiler. The aim of this study was to evaluate the effect of essential oils of *Lippia origanoides* – high thymol on cecal BD and composition of broiler chickens cecum by 16S rRNA amplicon sequencing through the use of pyrosequencing technology.

MATERIAL AND METHODS

Essential Oil Extraction

Aerial parts of *Lippia origanoides* kunth were collected and essential oils from these plants were obtained by steam distillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The steam and oil mixture was cooled through a condenser. The condensate was collected to allow phase separation. Oregano essential oil was collected in dark containers and kept at 4°C prior to further analysis and use.

Essential oil Analysis

The OEO were sent to the Laboratory of Chromatography of Universidad Industrial de Santander for analysis by GC/MS in an Agilent Technologies 6890 (Santa Clara CA) Plus gas chromatograph coupled with an ion trap detector mass spectrometer equipped with a FID detector and a DB-5 capillary column (J and W Scientific, Folsom, CA), 60 m x 0,25 mm, film thickness 0,25 um, (5%-phenyl-methylpolysiloxane column) was used for quantification and linear retention indices determination. Injector and detector temperatures were at 240^{o}C; split ratio, 5:1 mL/min. The essential oils constituents were identified by comparison of their relative retention times and mass spectra using the NIST data base and Wiley Registry of Mass Spectral Data. A standard solution of n-alkanes was used to obtain the retention indices.

Animal Husbandry and Treatments

A total of 720 one-day-old male Ross chickens, were randomly placed in 24 pens (30 broilers / Pen). This study was conduced under National University protocol of research animal care. Chicks were fed *ad libitum* a corn-soy diet to meet or exceed NRC requirements (1994) (Table 1). A pre-started feed was provided for the first 7 days and then was replaced by starter feed until broilers were 21 days old. Grower feed was provided for the remainder of the grow-out to 35 days. Two OEO levels in feed, 0 (C) and 100 ppm (O), two groups of broiler chickens, challenged with ooquistes of coccidia vaccine at 2X (E) and unchallenged (U), and their interactions were evaluated for a total of four treatments, C-U, C-E, O-U and O-E. The birds were orally inoculated with a 2X

dosage of coccidia vaccine equivalent to viable attenuated oocysts of *E. máxima* (6.3 x 10^3)*, E. tenella (*1,5 x 10^3), *E. acevulina* (0,7 x 10^3) and *E. necatrix* (0,7 x 10^3).

Table 1. Basal experimental diets

Ingredients, g kg^{-1}	**Pre-start. 1-7 d**	**Starter 7-21 d**	**Growth 21-42 d**
Corn	539.1	566.5	621.8
Soybeanmeal, 49% CP	277.1	254.0	203.2
Extrudedsoybean	100.0	100.0	100.0
Palm oil	17.9	21.7	18.8
Fishmeal	20.0	15.0	15.0
Dicalciumphosphate	14.3	13.6	12.0
Calcium carbonate	12.2	11.7	10.9
Vitamin-mineral trace	2.0	2.0	2.0
Salt	3.5	3.5	3.5
SodiumBicarbonate	3.0	3.0	3.0
L-LysineHCl	1.9	1.2	1.8
DL- Metihionine	2.1	1.5	1.5
L-Tyiptophan	1.1	0.3	0.6
Cl Choline 60%	1.0	1.0	1.0
Calculated composition, %			
Crudeprotein	22.61	21.14	19.40
M.E., kcal/g	3.000	3.050	3.100
Fat	6.67	6.95	6.50
Calcium	0.96	0.90	0.82
Total phosphorus	0.80	0.76	0.64
Available phosphorus	0.48	0.45	0.41
DEB, mEq/kg	257	247	224
Digest, Lysine	1.28	1.15	1.07
Digest Methionine	0.53	0.45	0.44
Total SAA	0.81	0.72	0.70
Digest Threonine	0.83	0.74	0.70

DEB: dietary electrolyte balance. Digest. Lysine: digestible Lysine

Sample Collection

Seven days postchalenge (23d) twenty chicks randomly selected from each treatment were humanely sacrificed by cervical dislocation and digestive tracts were removed. Ceca were removed and the contents from each section were collected aseptically. Samples of cecum content from five chickens were aseptically collected in 50 mL tubes; the samples were frozen and later lyophilized. Each tube contents the pool of intestinal content from five chickens into the same treatment to reduce individual within group variation (Zhou et al., 2007) and each treatment had four replicates.

Bacterial DNA extraction

The DNA was extracted from the cecum and using a modified protocol (Denman and McSweeney, 2005), which combines freezing and bead-beating with SDS and lysozyme treatment. Cecal samples were homogenized and 200 mg aseptically suspended in 1 mL of lysis buffer (2% SDS, 100 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 8.0) and 100 µL of potassium acetate solution pH 5.5 – 6.0 (29.4% of potassium acetate, 11.5% of glacial acetic acid). Suspensions were frozen in liquid nitrogen and thawed in boiling water for 3 min. The samples were bead-beaten for 2 min at maximum speed on a Mini-Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, OK) using 1.0 mm diameter glass beads (0.25 g). The freezing-thawing and bead-beating steps were repeated, Lysozyme (0.15 mg/mL final concentration) was added and the mixture was incubated at 37°C for 1.5 h. subsequently. DNA samples were precipitated by adding glassmilk (16.7% of silica, 3 M guanadinium isothyocianate) and washed with 100% ethanol. Finally, the DNA was suspended in 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8.0) buffer and stored at -20°C. DNA samples were quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France) and stored at −21°C.

bTEFAP sequencing PCR

Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) was performed at Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX). All DNA samples were adjusted to 100 ng/µL. A 100 ng (1 µL) aliquot of each samples DNA was used for a 50 µl PCR reaction. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) were performed using

Gray28F 5'TTTGATCNTGGCTCAG and Gray519R 5' GTNTTACNGCGGCKGCTG (Dowd et al., 2008). Initial generation of the sequencing library was utilized a one-step PCR with a total of 30 cycles, a mixture of Hot Start high fidelity taq polymerases, and amplicons originating and extending from the 28F for bacterial diversity. Tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing analyses utilized Roche 454 FLX instrument with titanium reagents, titanium procedures performed at the Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX) based upon RTL protocols (www.researchandtesting.com).

Data Processing

Pyrosequencing data was processed using the software Mothur v 1,21 (Schloss *et al.*, 2009) in order to minimize effects of sequencing errors, sequences that contained more than one undetermined nucleotide (N), reads that had more than 10 homopolymer and those with the Q-score average below 25 in a window of 50 pb were trimmed. Sequences trimmed with length < 50 bp after proximal PCR primer were eliminated. High quality reads were aligned using Needleman-Wunch algorithm and SILVA reference alignment database (Schloss, 2009). To maximize the number of sequences that overlap over the longest span, was used an algorithm that allows to keep sequence that started after the position that 85% of the sequences did it, furthermore, a preclustering step was implemented (Huse *et al.*, 2010) to reduce sequencing noise from pyrosequencing data. Besides, was used Uchime algorithm (http://drive5.com/uchime) without database to identify chimeras (Gomez-Alvarez *et al.*, 2009) and subsequently remove them. Afterwards, the sequences were classified using SILVA reference database with 1000 iterations and bootstrap threshold value of 85%. From a microbioma perspective, the populations inferred to exist on the basis of sequence data are referred as operational taxonomic units (OTUs) (Dethlefsen et al., 2008).

Sequence and sample Analyses

Prior to analysis the sequences, was generated a distance matrix to assign OTUs using average neighbor algorithm (Schloss and Handelsman, 2006) at 0,03 definition level. Afterwards, the alpha diversity was driven, the richness estimators Chao1, Ace, no parametric Shannon, inverse Simpson diversity index and rarefaction curves were calculated.

Statistical analysis

To compare the membership and structure of the communities using an OTU-based approach was generated a heatmap of relative abundance of each OTU across the samples, then was calculated the similarity of membership and structure in the communities with Jaccard, Bray-Curtis and Yue and Clayton coefficients, to describe the similarity of the samples to each other was generate a dendogram using the previews calculators and tested with unweighted and weighted Unifrac (Lozupone and Knight, 2005) to determine whether the clustering within the tree is statistically significant or not.

Ultimately, to evaluate if the spatial separation that we have seen between the treatments in the plots are statistically significant, was realized a analysis of molecular variance (amova) (Excoffier *et al.*, 1992; Martin, 2002; Schloss, 2008) testing whether the center of the clouds representing a group are more separated than the variation among samples of the same treatment. Additionally was performed a homova test (Stewart *et al.*, 1996, Schloss, 2008) to assess the molecular variance homogeneity (homcedasticity) of the treatments.

The effects of OEO and Challenge (CI) were analyzed by ANOVA on percentage of taxa identified respect total tags in taxa, moreover, was determined the effect of interaction OEO x CI, treatment means were tested for significance using General Linear Models (GLM) procedure of SAS software (SAS Institute, 2002). The percentage was transformed with the function square root (X + 1) for normalizer the percentages.

RESULTS

To estimate species richness, rarefaction curve was estimated by randomly sampling reads and plotting the number of novel 97% OTUs against the number of reads sampled. At 3% dissimilarity is possible to obtain reasonable estimation of species diversity (Dowd et al., 2008). The vertical axis shows the number of OTUs that would be expected to be found after sampling the number of tags or sequences shown on the horizontal axis (Fig. 1). Curvature toward the horizontal indicates the increased sequencing effort required to observe novel OTUs when only rare OTUs remain to be discovered (Dethlefsen et al., 2008). Therefore, using rarefaction curves, the number

predicted of OTUs that might occur in the cecum of the current groups of chickens was estimated. The plateau of the curve was no reached with the original rarefaction curve, suggesting that many more taxa remain to be discovered. A total of 107,774 pyrosequence reads (termed “pyrotags”) were produced from the amplicons; distributed in all treatments, 27,855, 29,021, 27,423 and 23,475 sequences for experimental groups, C-U, O-U, C-E and O-E, respectively. Trimmed reads were grouped into clusters with a 97% identity threshold, based on 3% difference in 16S rDNA, producing a total of 51,224 OTUs observed, 13,749, 13,300, 12,639 and 11,536 observed OTUs. About 35% of OTUs have one sequence; this means that they are singletons. The total number of OTUs obtained, and the maximum number estimated by different no parametric methods, Chao1 and ACE are shown in Fig. 2. Using these OTUs richness estimates, the number of sequences required to reach 97% of the maximum number of OTUs at 3% dissimilarity were 83,867, 72,688, 65,708 and 67,076 for C-U, O-U, C-E and O-E, respectively.

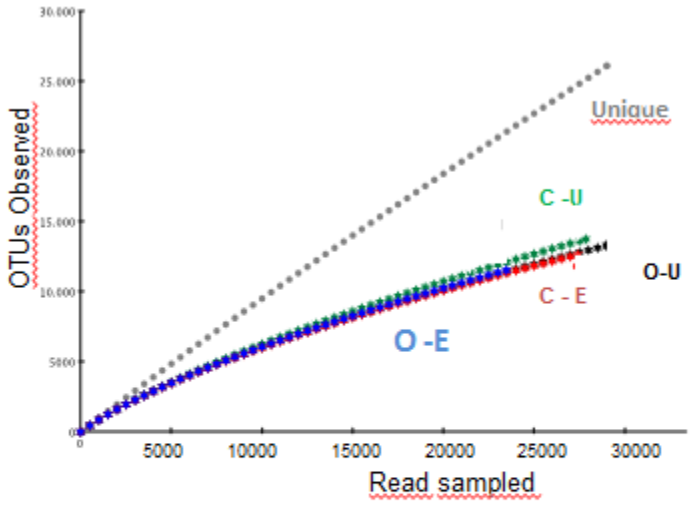


Fig. 1. Rarefaction curves by randomly sampling reads and plotting the number of novel 97% OTUs against the number of reads sampled from broiler chicken cecum. O-U: OEO treated + non-coccidia inoculated; O-E: OEO treated + coccidia-inoculated; C-U: Non-OEO treated + non-coccidia-inoculated; C-E: Non-OEO treated + coccidia-inoculated.

Based on Venn diagram (Fig. 3) the lower shared OTUs was presented by O-E vs C-E, C-E vs C-U, O-U vs C-U with about 27% shared OTUs. In contrast, the higher shared OTUs were presented between C-E vs O-U with 34% of shared OTUs. When the OTUs are estimated on base Chao statistical, no differences important were observed, with Shared OTUs about 20-23% to the same comparisons.

With the analysis of Bray-curtis index, similar results were founded, C-U vs O-E and O-U vs. C-E, presented the lower dissimilarity. While, the groups O-E vs O-U presented the highest dissimilarity. Similar results were founded with abundance based Jaccard dissimilarity and Morisita-Horn index (Fig. 4). To complement this analysis, dendograms were generated from Bray-curtis, Jaccard and Thetacyc and were obtained de same results, two different clusters, O-E – C-U vs C-E – O-U (Fig. 5).

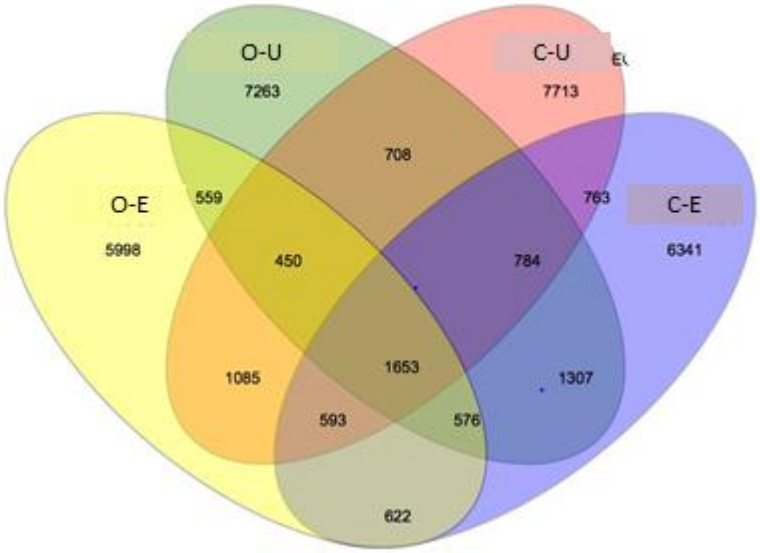


Figure 3: Shared observed OTUs Venn Diagram at distance 0.03.

Microbial community composition.

In a general description respect to total bacterial sequences for all samples, the relative abundance of taxa detected are presented in Fig. 6, the percentage of more important phylum and class calculated on base of total OTUs in each taxa identified are presented. The dominant classified phylum was Firmicutes; comprised 36% of the reads in each amplicon data set, but unclassified phyla were highest, 62%.

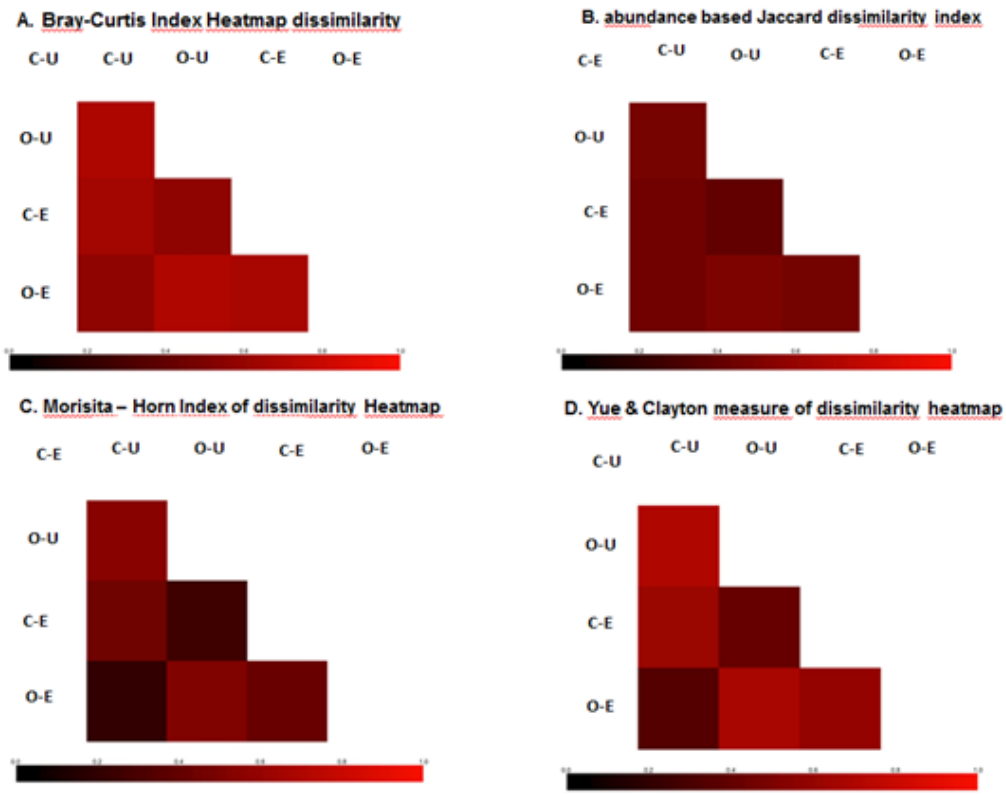


Fig. 4. Heatmap of relative abundance an dissimilarity of each OUT across the samples of broiler chicken cecum. O-U: OEO treated + non-coccidia inoculated; O-E: OEO treated + coccidia-inoculated; C-U: Non-OEO treated + non-coccidia-inoculated; C-EI: Non-OEO treated + coccidia-inoculated.

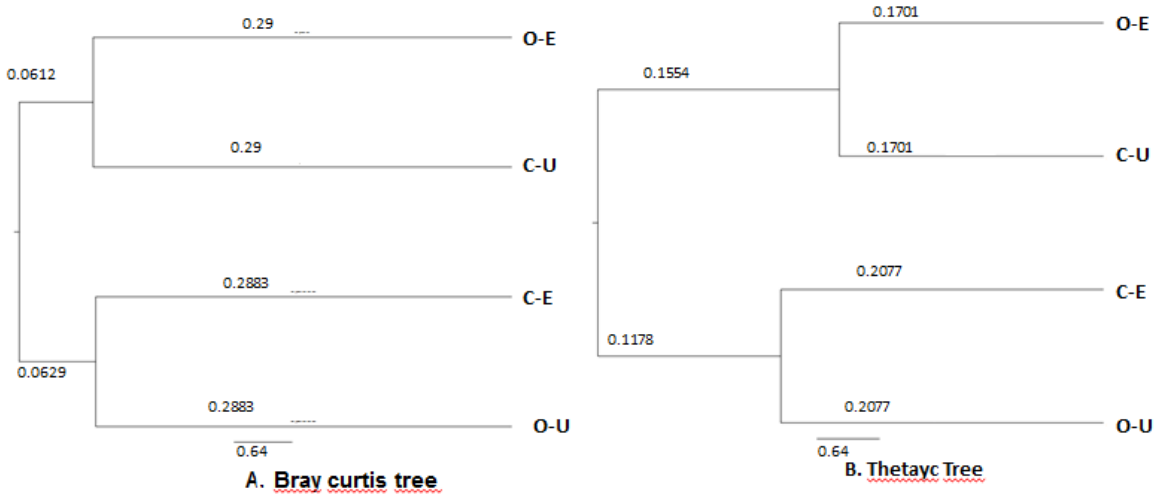


Fig. 5. Dendograms to compare the experimental groups.

A handful of other phyla each representing ≤ 1% of reads, including, Proteobacteria and Bacteroidetes. At class level, Clostridia was dominant in the Firmicutes Phylum, 95%, followed Bacilli, 3% and unclassified, 1%. At order level, Clostridiales represented 99.8% of Clostridia class and Lactobacillales represented the 94.3% of Bacilli class. When family is analyzed, Ruminococcaceae (28.6%) Lachnospiraceae (22.4%) and unclassified (43.1%) were the families more important within Clostridiales order. Lactobacillaceae (55.9%), Estreptococcaceae (22.7%) and Enterococcaceae (11.2%) were the dominant families to Lactobacillales order.

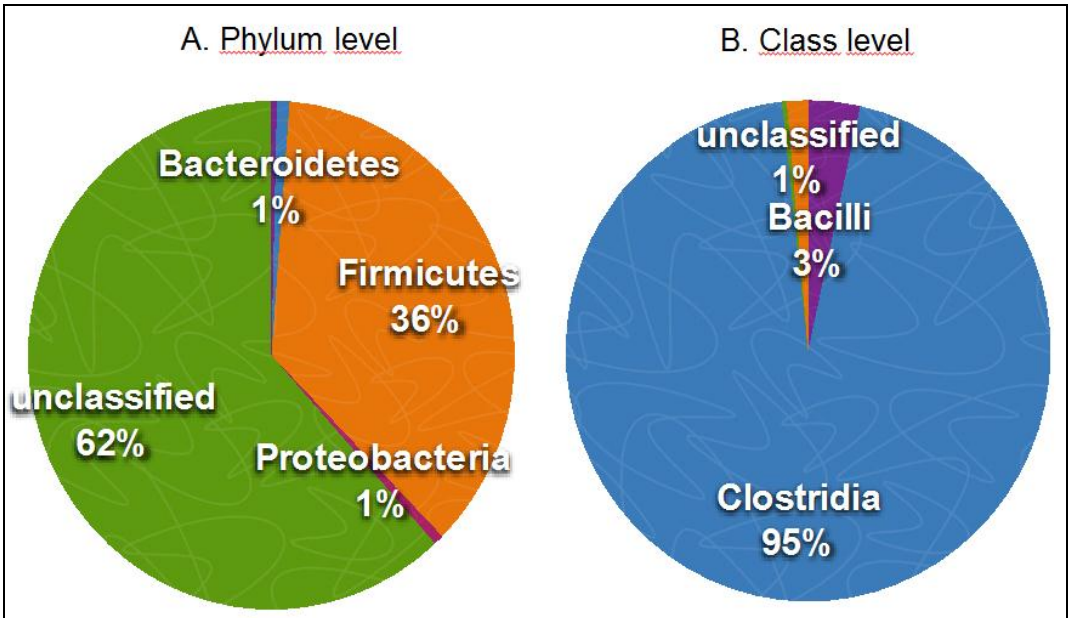


Fig. 6. Microbioma composition of broiler chicken cecum

At gender level, was computed the gender percentage respect to total OTUs classified within Bacteria dominium. When Ruminococcaceae family is analyzed, the dominant classified genders established in the broiler chicken cecum were, *Faecalibacterium, Butyricicoccus* and *Subdoligranulum*, with 4.9, 2.1 and 2.1%, respectively. To Lachnospiraceae family, the greatest were unclassified gender (97.2%); similar to Clostridiaceae family, which 92.2% were unclassified genders. *Lactobacillus* (1.4%), *Estreptococcus* (0.5%), and *Enterococcus* (0.3%) were the dominant gender respect to total OTUs identified in Lactobacillaceae, Estreptococcaceae and Enterococcaceae families, respectively. Some important pathogenic genders for poultry are within Proteobacteria phylum, its percentage was 1%. The dominant genders of Enterobacteriaceae family were *Eschcerichia* (53.6%) and *Salmonella* (5.4%) (*Salmonella* gender was only detected in 4/16 samples).

Effect of OEO and coccidia inoculum

At Phylum and class level, no differences were observed by effect of OEO and challenge on cecum microbial community of broiler chicken, with a minimal variation between and within the evaluated factors. When was analyzed the effect of OEO

supplementation on challenge, were reduced Estreptococcacea, Faecalibacterium, Pseudomononales, *Clostridium* and *Salmonella* bacterial groups (Tabla 2 and 3). In contrast, Faecalibacterium and Clostridium were the highest in challenged broiler chicken cecum, and *Gemella*, *Pasterella* and *Enterobacter* were only founded to C-U groups. The same to diversity results, the greatest similarity between C-U vs O-E groups was for Clostridium and the lowest percentages of *Faecalibacterium*, Pseudomonales and *Salmonella*; while the greatest similarity was between O-U vs. C-E because these groups presented the highest percentage of *Clostridium, Faecalibacterium, Pseudomonas* and *Salmonella* gender. The benefic gender *Lactobacillus* no was affected by two factors evaluated and no variation was observed between and within experimental groups with 94.3 ± 0.64% into Lactobacillaceae family. The OEO supplementation showed different effect on microbial community of broilers, while to E groups, the OEO supplementation, reduced pathogenic bacterial groups, to U, the OEO supplementation increased or remained high Estreptococacea*, Faecalibacterium* and Pseudomonales ($P < 0.05$). Within the Proteobacteria phylum, Gammproteoabacteria class was the most abundant (Table 3.). Different effect was observed as response to O on this phylum, while Alphaproteobacteria was duplicated by O in U groups, in E groups no effect was observed. Citrobacter was founded only in C-U; *Enterobacter*, *Gemella* and *Pasteurella* genus only was detected in C-E groups. No differences were observed for *Escherichia* but *Salmonella* genus was not detected in C-U groups, the OEO supplementation slowed it in E groups (from 6.5 to 3.2%).

Table 2. Relative abundance of microbial community from broiler chicken cecum (%).

Tax. Level: Phylum, Class,	C		O		P value		
Order, Family and Gender	E	U	E	U	O	E	O*E
Phyllum Firmicutes	39.0	38.6	41.0	38.2	0.608	0.986	0.56
Bacilli	4.9	3.4	4.0	3.0	0.471	0.165	0.682
Clostridia	92.6	94.7	94.3	94.5	0.303	0.166	0.113
Erysipelotrichi	0.6	0.4	0.3	0.6	0.941	0.508	0.083
Unclassified	1.2	1.0	0.8	1.3			
Class Bacilli							
Bacillales	9.0	3.3	4.3	3.8	0.727	0.367	0.906
Lactobacillales	89.7	95.6	95.7	96.2	0.976	0.603	0.700
Unclassified	0.9	1.1	0.0	0.0			
Class Clostridia							
Clostridiales	99.8	99.7	99.9	99.7	0.669	0.181	0.117
Unclassified	0.1	0.2	0.1	0.2			
Order Bacillales							
Bacillaceae	0.0	33.3	0.0	0.0			
Staphylococcaceae	100.0	66.7	100.0	100.0			
Order Lactobacillales							
Enterococcaceae	11.0	15.1	12.8	6.0	0.291	0.767	0.056
Lactobacillaceae	54.1	51.7	60.6	57.3	0.591	0.751	0.901
Streptococcaceae	24.9	23.3	16.1	26.7	0.838	0.999	0.965
Unclassified	4.8	5.2	5.6	7.3			
Order Clostridiales							
Clostridiaceae	1.1	1.3	1.3	0.8	0.641	0.985	0.059
Incertae_Sedis_XIV	0.8	0.4	0.7	0.5	0.351	0.143	0.777
Lachnospiraceae	22.6	21.7	21.9	23.2	0.554	0.361	0.555
Ruminococcaceae	26.5	30.7	29.5	27.9	0.700	0.127	0.978
Veillonellaceae	1.1	0.2	2.0	0.1	0.388	0.160	0.462
Unclassified	44.4	42.5	41.5	44.0			

Family Staphylococcaceae							
Gemella	4.8	0.0	0.0	0.0			
Enterococcus	82.6	80.8	91.3	88.9	0.252	0.383	0.196
Unclassified	13.0	11.5	4.3	11.1			
Family Lactobacillaceae							
Lactobacillus	95.6	93.3	90.8	97.7	0.469	0.712	0.987
Unclassified	0.9	3.4	6.4	1.2			
Family Streptococcaceae							
Streptococcus	23.3	26.7	24.9	16.1	0.838	0.998	0.964
Family Clostridiaceae							
Clostridium	4.3	0.0	0.0	2.4			
Geosporobacter	2.1	3.2	8.6	4.9	0.664	0.884	0.324
Unclassified	93.6	95.2	89.7	90.2			
Family Lachnospiraceae							
Dorea	1.7	1.3	0.7	1.3	0.823	0.488	0.008
Unclassified	96.4	97.2	97.6	97.4			
Family Ruminococcaceae							
Butyricicoccus	9.0	8.0	9.9	9.5	0.255	0.241	0.535
Faecalibacterium	23.7	15.7	12.8	20.7	0.288	0.703	0.041
Oscillibacter	3.2	3.4	3.2	2.0	0.458	0.458	0.458
Sporobacter	0.4	1.5	1.2	0.5	0.832	0.623	0.002
Subdoligranulum	8.0	8.6	9.9	7.1	0.297	0.128	0.333
Unclassified	52.1	59.7	60.3	56.9			

O-U: OEO treated + non-coccidia challenged; O-E: OEO treated + coccidia-challenged; C-U: Non-OEO treated + non-coccidia-challenged; C-E: Non-OEO treated + coccidia-challenged.

Table 3. Relative abundance of microbial community from broiler chiquen cecum

	C		OEO		P Value		
Taxa level	CI	UCI	CI	UCI	OEO	CI	OEO*CI
Phyllum Proteobacteria	0.4	0.5	1.0	0.6	0.028	0.444	0.004
Alphaproteobacteria	5.1	7.0	6.3	12.5	0.096	0.795	0.018
Betaproteobacteria	22.8	12.7	23.4	6.3	0.497	0.013	0.203
Deltaproteobacteria	2.5	1.4	0.0	0.0			
Gammaproteobacteria	68.4	78.9	70.3	79.2	0.758	0.637	0.937
unclassified	1.3	0.0	0.0	2.1			
Class Gammaproteobacteria							
Enterobacteriales	57.4	71.4	79.5	36.8	0.448	0.999	0.084
Pasteurellales	1.9	0.0	0.0	0.0			
Pseudomonadales	29.6	19.6	16.7	36.8	0.883	0.983	0.817
unclassified	5.6	3.6	1.3	2.6			
Famiy Enterobacteriaceae							
Citrobacter	0.0	5.0	0.0	0.0			
Enterobacter	6.5	0.0	0.0	0.0			
Escherichia/Shigella	51.6	57.5	61.3	35.7	0.411	0.285	0.148
Proteus	0.0	0.0	0.0	7.1			
Salmonella	6.5	0.0	3.2	7.1			
unclassified	29.0	25.0	25.8	35.7			

OEO-UCI: OEO treated + non-coccidia inoculated; OEO-CI: OEO treated + coccidia-inoculated; C-UCI: Non-OEO treated + non-coccidia-inoculated; C-CI: Non-OEO treated + coccidia-inoculated

DISCUSSION

A new method for studying the microbial community of broilers cecum was introduced, bacterial tag-encoded FLX 16s rDNA amplicon pyrosequencing (bTEFAP); this study demonstrated the power of this method for explorer the diversity within broiler cecum ecosystems. It is a method relatively inexpensive in time and labor (Dowd et al.,

2008). Through this technique we detected population below 0.1%. This method is important because permit found a much better understanding of microbioma from regions of the gut, in response of different conditions. Studies in broiler chicken for describing the microbial community in cecum by pyrosequencing are scare. In contrast, studies in humans have proved the utility of method and have established the relationship between bacterial groups present in gut with metabolic disorders (Roesch et al., 2009).

Table 2. Relative abundance of microbial community from broiler chiquen cecum

	C		O		P value		
Taxa level	E	U	E	U	O	E	O*E
Phyllum Proteobacteria	0.4	0.5	1.0	0.6	0.028	0.444	0.004
Alphaproteobacteria	5.1	7.0	6.3	12.5	0.096	0.795	0.018
Betaproteobacteria	22.8	12.7	23.4	6.3	0.497	0.013	0.203
Deltaproteobacteria	2.5	1.4	0.0	0.0			
Gammaproteobacteria	68.4	78.9	70.3	79.2	0.758	0.637	0.937
Unclassified	1.3	0.0	0.0	2.1			
Class Gammaproteobacteria							
Enterobacteriales	57.4	71.4	79.5	36.8	0.448	0.999	0.084
Pasteurellales	1.9	0.0	0.0	0.0			
Pseudomonadales	29.6	19.6	16.7	36.8	0.883	0.983	0.817
Unclassified	5.6	3.6	1.3	2.6			
Famiy Enterobacteriaceae							
Citrobacter	0.0	5.0	0.0	0.0			
Enterobacter	6.5	0.0	0.0	0.0			
Escherichia/Shigella	51.6	57.5	61.3	35.7	0.411	0.285	0.148
Proteus	0.0	0.0	0.0	7.1			
Salmonella	6.5	0.0	3.2	7.1			
Unclassified	29.0	25.0	25.8	35.7			

O-U: OEO treated + non-coccidia challenged; O-E: OEO treated + coccidia-challenged; C-U: Non-OEO treated + non-coccidia-challenged; C-E: Non-OEO treated + coccidia-challenged

This study permitted monitors the effect of essential oil from *Lippia origanoides*, high thymol and challenge with oocysts coccidia attenuated. The challenge was made to obtain a less clean ambient, found in commercial conditions based on previous studies that have probed by DGGE drastic changes in microbial community after coccidia challenge (Oviedo-Rondon et al., 2006; Hume et al., 2011).

Using rarefaction curves were estimated the predicted number of species of bacteria that might occur in the cecum of broilers. The total reads obtained in this study were higher respect to another works. Andersson et al. (2008) reported a total of 61,678 reads from 18 samples of human intestinal content. Dowd et al. (2008) reported 10,500 sampled sequences in pig ileum, this study overcame these results. Other studies have found that microbial diversity in gut is associated directly health status; the microbial diversity in gut was lower in disease individuals (Dicksved, 2008). In this study, no clinical symptoms were observed in broiler chicken. Other factors such as the feed withdrawal alter the microbial populations and decreasing bacterial diversity in broilers ileum showed by DGGE (Thompson et al., 2008). Based on dissimilarity index dendograms, the OEO supplement presented different effect on richness and abundance of species in broiler cecum of E and U treatments.

From the perspective of poultry production is still unknown respect to what should be the ideal profile for the best productive performance and health because a small studies describing the cecum microbioma in broiler chicken. The most of the studies utilize fingerprinting technics such as denaturant gradient gel electrophoresis, these techniques have permitted an approach to assess factors that affect the diversity of the microbial community of the intestine, but these fingerprinting diversity methodologies ignore identities of microbial populations.

Prevalent bacteria detection.

In a general description, the chicken cecum was dominated by Firmicutes phylum, Clostridia was the major class and the most abundant genders were *Faecalibacterium*, *Butyricicoccus* and *Subdoligranulum* of Ruminococcaceae family, and *Lactobacillus* of Lactobacilaceae family. Similar to this study, Bjerrum et al. (2006) showed too that *Faecalibacterium* was a dominant gender in broiler chicken cecum. In contrast, Callaway

et al. (2009) founded that *Bacteroides, Prevotella, and Clostridium*, were the most commons genera isolated from cecal contents of laying hens. It is possible that the age and physiological status affect the microbial community. However, more than 60% of phyla OTUs were unclassified in this study. In contrast, Bjerrum et al. (2006) by other sequencing techniques reported <97% of 557 cloned sequences were related to know cultured species. When both technics are compared, less phylogenetic information is available from a single pyrosequencing read such us obtained of this study than from near full-length 16S rRNA gene sequence of Bjerrum study, but Pyrosequencing reads are highly informative (Liu et al., 2007). On the other hand, well over 300,000 short 16S rRNA sequence reads, which we refer to as tags, can be obtained in a single run of the Genome Sequencer FLX System. In comparison, two runs of a state-of the- art capillary Sanger sequencer are required to obtain at < 600 full-length 16S rRNA sequences (Bjerrum et al., 2006).

Some bacteria as *Butyricicoccus* can be beneficial because produce butyrate, butyrate is an organic acid with beneficial effects for broiler chicken intestinal health, but no effect of the E and OEO supplementation on this bacterial group was observed, Eeckhaut et al. (2008) founded this bacteria through a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. The other hand, *Faecalibacterium* and *subdoligranulum* have been monitored by Real–Time PCR in the cecum of chickens, for example, Lund and Bjerrum (2010) probed that *Faecalibacterium prausnitzii* and *Subdoligranulum* variable-like groups constituted a major fraction of the cecal bacterial community in chickens. However, factors such as the diet, additives and the environment can affect the development of bacteria in intestinal microflora. The present study, no effect of O or E was observed on *Subdoligranulum* gender. Torok et al. (2011) showed the influence of antimicrobial feed additives on posthatch gut microbiota development and performance. They founded that Lachnospiraceae *Lactobacillus johnsonii*; *Ruminococcaceae*, Clostridiales and Oxalobacteriaceae were less prevalent in the gut of chicks raised on the antimicrobial free diet.

Traditionally, the Proteobacteria phylum (*Escherichia, Salmonella*) and *Clostridium* are considered associated with diseases, but this study founded additionally another

bacterial groups that were associated with challenge as *Gemella, Pasteurella, Enterobacter* and were controlled with OEO supplementation.

Despite the existence of these next-generation molecular technics, microbial processes and interactions within the gut and health and productive performance, remain a black box. Thus, the understanding of diversity of gut community and them interactions with animal metabolism and physiology is important to evaluate the effectiveness of additives and association of microbial community with the growth rate and efficiency.

From a microbioma perspective, there is pausity of research to describing the cecum microbial populations in broiler chicken. Instead, the populations inferred to exist on the basis of sequence data are referred to as OTUs, which can be defined in various ways and at different levels of resolution (Dethlefsen et al., 2008).

Turnbaugh et al. (2006) concluded that both microbial and host contributions to metaboloma must be considered in order to understand the regulation of energy balance. Studies in human have associated diabetes and obesity with specific bacterial groups in digestive tract (Zhang et al., 2009). In broiler chicken, have been showed that environmental stressors cause changes in the normal intestinal microbiota and epithelial structure and susceptibility to pathogens as *Salmonella* (Burkholder et al., 2008) similar to the observed in this study by effect of coccidia challenge. In contrast, the use of additives can alter the intestinal microbiota and determine positive association with energy metabolism (Torok et al., 2011). The present study showed a correlation of broiler chicken body weight at 35 d with *Staphylococcus* ($r = -0.79$, $p<0.05$), *Blautia* ($r = -0.58$, $p<0.05$), *Salmonella* ($r = -0.51$), *Enterococcus* ($r = -0.45$), and *Dorea* ($r = -0.45$) percentage. New associations between health and microbial community with this molecular technics can be establishing. Lack determines which microorganisms are at the boundary between health and disease. In this study, the level used of oocysts from coccidia vaccine used did not caused symptoms.

However, the microbial world is very extends and monitor it by short samples in at specific points of space and time is not sufficient to fully describe the microbiome (Sloan et al., 2007). A new phase in the exploration of de microbiome is recommended, and can

be developed by use taxa-abundance distributions applying robust statistical methods is suggested (Quince et al., 2008).

This method allowed establishing that OEO supplementation to Chllenged broiler chickens led to obtain a better similarity of cecum microbial community composition respect to control groups. The bacterial groups traditionally associated with disease such as *Clostridium, Escherichia* and *Salmonella*, represented less than 1% of the cecal microbial profile of broiler chicken. In contrast, more than 60% of OTUs were unclassified. The negative association between different bacterial groups should be analyzed in subsequent studies. Chicken cecal samples was consistent in that Firmicutes phylum and Clostridia class were highly prevalent and found in all of the cecum sample of broiler chicken.

REFERENCES

Amit-Romach, E., D. Sklan, Z. Uni. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. Poult. Sci. 83: 1093.

Andersson A. F., M. Lindberg, H. Jakobsson, F. Bäckhed, P. Nyrén, and L. Engstrand. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PLoS ONE 3(7): e2836. doi:10.1371/journal.pone.0002836.

Bjerrum, L., R. M. Engberg, T. D. Leser, B. B. Jensen, K. Finster, and K. Pedersen. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. Poult. Sci. 85: 1151–1164.

Burkholder, K. M., K. L. Thompson, M. E. Einstein, T. J. Applegate, and J. A. 2008. Patterson influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to salmonella enteritidis colonization in broilers. Poult. Sci. 87: 1734 – 1741.

Callaway, T. R., S. E. Dowd , R. D. Wolcott , Y. Sun , J. L. McReynolds , T. S. Edrington, J. A. Byrd , R. C. Anderson, N. Krueger , and D. J. Nisbet. 2009. Evaluation of the

bacterial diversity in cecal ontents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. Poult. Sci. 88: 298–302.

Denman, S. T., and C. S. McSweeney. 2005. Quantitative (real time) PCR. Pages 105-120 in Methods in gut microbial ecology for rumiants. FAO. IAEA. Ed Springer.

Dethlefsen. L, S. Huse, M. L. Sogin, D. A. Relman. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS Biol 6(11): e280. doi:10.1371/journal.pbio.0060280.

Dicksved. J. 2008. Exploring the human intestinal microbiome in health and disease. Epsilon Dissertation and Graduate Theses archive. Doctoral Thesis. SLU University Library. In http://diss - epsilon.slu.se:8080/archive/00001760/01/Dicksved_Thesis_Kappan.pdf.

Dowd, S. E., Y. Sun, P. R. Secor, D. D. Rhoads, B. M. Wolcott, G. A. James, and R. D. Wolcott. 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. BMC Microbiol 8: 43.

Dowd, S. E., S. Yan, D. W. Randy, A. Domingo, and A. C. Jeffery. 2008. Bacterial tag–encoded FlX amplicon pyrosequencing (btefap) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. Pages 459-472 in Foodborne Pathogens and Disease. Mary Ann Liebert, Inc.

Droege, M. and B. Hill. 2008. The Genome Sequencer FLXTM System—longer reads, more applications, straightforward bioinformatics and more complete data sets. J. Biotech. 136: 3-10.

Eeckhaut, V. V, V. Immerseel, F. Filip; E. E. Teirlynck; F. F. Pasmans, V. V. Fievez. 2008. Butyricicoccus pullicaecorum gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2799-2802.

Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.

Gomez-Alvarez, V., T.K. Teal, and T. M. Schmidt. 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. The ISME J. 3: 1314-1317.

Hernández, F., J. Madrid, V. Garcia, J. Orengo, and M. D. Megias. 2004. Influence of two plant extracts on br oiler performance, digestibility and digestive organ size. Poult. Sci. 83: 169-174.

Hooper, L. V., and J. I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science 292: 1115–1118.

Hooper, L. V. 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. Trends Microbiol. 12: 129–134.

Hume, M. E., N. A. Barbosa, S.E. Dowd, N.K. Sakomura, A. G. Nalian, A. M-V. Kley, and E.O. Oviedo Rondón. 2011. Use of pyrosequencing and denaturing gradient gel electrophoresis to examine the effects of probiotics and essential oil blends on digestive microflora in broilers under mixed *Eimeria* infection. Foodborne Patrhogens and Disease. Doi: 10.1089/pdf.2011.0863.

Huse, S. M., D. M. Welch, H. G. Morrison, and M. L. Sogin. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. Environ. Microbiol. 12: 1889-1898.

Jamroz D., J. Orda, C. Kamel, A. Wiliczkiewicz, T. Wertelecki y J. Skorupinska, 2003. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. J. Anim. Feed Sci. 12: 583-596.

Korver, D. R. 2006. Overview of the immune dynamics of the digestive system. J. Appl. Poult. Res. 15:123.

Lan, Y., M. W. Verstegen, S. Tamminga, and B. A. Williams. 2005. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. World's Poult. Sci. 61: 95-104.

Liu, Z., C. Lozupone, M. Hamady, F. D. Bushman, R. Knight. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. Nucleic Acids Res. 35: e120.

Lozupone, C., and R. Knight. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8228-8235.

Lund, M. M. and L. L. Bjerrum. 2010. Quantification of *Faecalibacterium* prausnitzii- and *Subdoligranulum* variabile-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. Poult. Sci. 89: 1217-1224.

Martin, A. P. 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3673-3682.

Martínez, I., G. Wallace, C. Zhang, R. Legge, A. K. Benson, T. P. Carr, E. N. Moriyama, and J. Walter. 2009. Appl. Environ. Microbiol. 75: 4175–4184.

Nocker, A., M. Burr, A. K. Camper. 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. Microb. Ecol. 54:276–289.

National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Oviedo-Rondón, E. O., M. E. Hume, C. Hernández and S. Clemente-Hernández. 2006. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. Poult. Sci. 85: 854-860.

Pedroso, A. A., J. F. M. Menten, and M. R. Lambaist. 2005. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. J. Appl. Poult. Res. 14: 232-237.

Quince C., T. P Curtis, and W. T Sloan. 2008. The rational exploration of microbial. Diversity. The ISME J. 2: 997–1006.

Roesch, L. F., R. R. Fulthorpe, A. Riva, et al. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J. 1: 283–290.

Roesch, L. F., G. L. Lorca, G. Casella, A. Giongo, A. Naranjo, A. Pionzio, N. Li, V. Mai, C. H. Asserfall, D. Schatz, M. A. Atkinson, J. Neu, and E. Triplett. 2009. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. ISME J. 3: 536 – 548.

SAS Procedures Guide (Version 9). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2002. Tannock GW. Studies.

Sloan W. T., S. Woodcock, M. Lunn, I. M. Head, and T. P. Curtis. 2007. Modeling taxa-abundance distributions in microbial communities using environmental sequence data. Microbial Ecol. 53: 443–455.

Schloss, P. D. 2009. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. PloS one 4: e8230.

Schloss, P. D., S. L.Westcott, T. Ryabin. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75: 7537-7541.

Schloss, P. D. 2008. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. The ISME J. 2: 265-275.

Schloss, P.D., and J. Handelsman. 2006. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6773-6779.

Stewart, C. N. J., G. Rosson, B .W. Shirley, and D. M. Poter. 1996. Population genetic variation in rare and endangered Iliamna (Malvaceae) in Virginia. Biol. J. Linnean Soc. 58: 357-369.

Thompson, K., K. Burkholder, J. Patterson, and T. J. Applegate. 2008. Microbial ecology shifts in the ileum of broilers during feed withdrawal and dietary manipulations. Poult. Sci. 87: 1624-1632.

Torok, V. A., V. A. Allison, E. Gwen, G. E. Percy, J. Nigel, N. J. Ophel-Keller, K. Kathy, J. Hughes, R. J. Robert. 2011. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. Appl. Environ. Microbiol. 77: 3380-3390.

Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, J. I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444: 1027–1031.

Turnbaugh, P. J., F. Backhed, L. Fulton, and J. I. Gordon. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host & Microbe 3: 213–223.

Yang, Y., P. A. Iji and M. Choct. 2009. Six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. World's Poult. Sci. J. 65: 97- 114.

Zhang, H. J., K. DiBaise, A. Zuccolo, D. Kudrna, M. Braidotti, Y. Yu., P. Parameswaran, M. D. Crowell, R. Wing, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown. 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. PNAS. ww.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0812600106 PNAS. 106: 2365–2370.

Zhou, H., J. Gong, J. T. Brisbin, H. Yu, B. Sanei, P. Sabour, and S. Sharif. 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. Poult. Sci. 86: 2541–2549.

Discusión General

Existen en la literatura un número marginal de estudios e investigaciones sobre el uso de aceites esenciales de orégano en pollos de engorde y sus implicaciones desde el punto de vista de la productividad y de los ciclos comerciales de producción. En general el objetivo es encontrar una respuesta al uso de aceites esenciales en reemplazo de los antibióticos promotores de crecimiento (APC), como una respuesta a las últimas tendencias mundiales, como la decisión tomada por la Comunidad Económica Europea sobre la prohibición de los APC a finales del año 2005, basada en las preocupaciones públicas y políticas relacionadas con el uso elevado de estos antibióticos con potenciales de transmisión de factores de resistencia que comprometían el uso de antibióticos a nivel terapéutico en los humanos. Las especies más afectadas por esta decisión fueron los cerdos y las aves. Surgió entonces una tendencia por buscar nuevas alternativas naturales que no despertarán unos sentimientos similares del control social, ante la problemática presentada. De otra parte, la producción orgánica de carne ha sido un sector emergente con amplias posibilidades de mercado y que no permite el uso de los APC. En este contexto, el objetivo global de este proyecto fue el desarrollo de extractos de plantas de orégano para reemplazar el uso de aditivos químicos y APC utilizados en la formulación de sistemas de alimentación para pollos de engorde.

Los materiales vegetales fueron colectados de un medio natural, el valle del Alto Patía y de cultivos comerciales para producción de orégano como condimento en la Sabana de Bogotá. Como control se utilizó un producto comercial posicionado en el mercado mundial a base de orégano griego. Los diferentes extractos fueron evaluados por su actividad antibacterial *in vitro*, por su habilidad para manipular la ecofisiología intestinal, mejorar los procesos digestivos y metabólicos de pollos de engorde y sus impactos sobre la producción y productividad de la carne de pollo. El estudio intenta entregar una base de acervo científico y tecnológico sobre dichos extractos y busca encontrar soluciones sostenibles a la problemática de uso de aditivos alimenticios

convencionales. Igualmente, permite valorar la relevancia de un nicho natural para el posterior desarrollo de productos con base en aceites esenciales de orégano (AEO).

Composición y propiedades antimicrobianas in vitro de los AEO

La composición de los aceites esenciales a menudo cambia entre diferentes partes de la planta. El polimorfismo fitoquímico a menudo se presenta entre diferentes órganos de la planta. Este polimorfismo ha sido detectado en orégano por diferencias en la composición entre las glándulas de aceite, diferencias atribuibles a la edad de las glándulas (Grassi et al., 2004; Johnson et al., 2004; Schmiderer et al., 2008). Este polimorfismo también es encontrado cuando se compara la composición de aceites esenciales de plantas individuales dentro de una especie (variación intraespecifica o quimiotipos). Estas diferencias han sido reportadas en oréganos comerciales provenientes de Turquía (Baser, 2002).

En una investigación sobre poblaciones nativas de *Lippia graveolens* colectadas en las laderas de Guatemala, tres diferentes quimiotipos de aceites esenciales fueron identificados: uno alto en timol, uno alto en carvacrol y otro completamente irregular (Fischer et al., 1996). El quimiotipo rico en timol contenía más del 85% de los compuestos del aceite esencial y la concentración de carvacrol correspondía a trazas, un quimiotipo que es similar al encontrado en este estudio con aceites esenciales de la cuenca alta del río Patia. En general se puede indicar que el orégano es un ejemplo clásico e interesante de diversidad, la cual abarca la mayoría de especies disponibles a nivel comercial alrededor del mundo. Más de 60 especies de plantas son usadas bajo este nombre común mostrando perfiles de sabores similares caracterizados principalmente por la presencia de compuestos cimilicos (carvacrol y timol). Con muy pocas excepciones la mayoría de especies de orégano pertenecen a las familias Lamiaceae y Verbenaceae con los principales géneros *Origanum* y *Lippia.* En el presente estudio, el material vegetal obtenido de diferentes nichos de la cuenca del Patía presentó variaciones de timol entre 68 – 85% (resultados no reportados en el trabajo). Con estos resultados y los obtenidos en los quimiotipos cultivados en Sabana de Bogotá, se puede concluir que hay una concentración constante relativa en los metabolitos dominantes dentro de cada quimiotipo trabajado. Así, el metabolito dominante para *O. vulgare H* fue

el carvacrol, en *Lippia origanoides* fue el timol y en *O. majorana* fue el sabineno y sus derivados.

Los aceites esenciales de orégano en estudios *in vitro* exhiben una actividad antibacteriana de amplio espectro (Sivropoulou et al., 1996; Hammer et al., 1999; Dorman y Deans, 2000; Lambert et al., 2001) los cuales han sido atribuidos al contenido de carvacrol (Aligiannis et al., 2001). Otros estudios se relacionan con los contenidos de carvacrol y timol (Baratta et al., 1998; Rhayour et al., 2003). Los estudios disponibles en su mayoría se han centrado en la evaluación de bacterias cultivables en el laboratorio y asociadas con disturbios en la salud animal, como *Clostridium, Salmonella, E. coli, Campilobacter,* entre otras. Pero no se ha generado un acervo importante de conocimiento acerca del efecto de los AEO, carvacrol y timol sobre los microorganismos benéficos *Lactobacillus, Bifidobacterium*, razón por la cual, este fue otro blanco de estudio.

La concentración mínima inhibitoria que es definida como la más baja concentración a la cual es inhibido el crecimiento visible de un organismo en prueba (Hammer et al., 1999). En este estudio se evaluaron los principales quimiotipos de AEO: tipo-carvacrol (*O. vulgare L.* ssp*. hirtum*), tipo-timol (*L.origanoides* Kunth) y tipo sabineno (*O. majorana*) descritos en previos estudios por Skoula y Harbone (2002). En un primer ensayo, se determinó la actividad antibacterial como la concentración mínima bactericida frente a las bacterias reportadas tradicionalmente como entre las de mayor impacto en la salud y producción de pollo de engorde, *Salmonella sp* y *Escherichia coli*, así como las benéficas, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium breve*. Los resultados indicaron que la actividad antibacterial estuvo directamente asociada con el contenido de carvacrol y timol del AEO. Son diversos los mecanismos que explican este efecto, en el caso de bacterias Gram negativas, carvacrol y timol desintegran la membrana, liberando los lipopolisacáridos lo cual incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP, permitiendo la salida de iones del citoplasma generando una desestabilización y muerte de la bacteria (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001). Otro mecanismo que se ha estudiado es la inhibición del “quorum sensing” de las bacterias (Vattem et al., 2007). En su orden, la actividad antibacterial más alta fue para *O. vulgare* H, *L. origanoides* y *O. vulgare L*., siendo importante destacar que *L. origanoides* y *O. majorana* mostraron el mínimo efecto antibacterial contra bacterias benéficas, no reportado en

estudios previos. Estos resultados *in vitro* permiten concluir que la actividad antibacterial de los AEO es ideal en un medio como el TGI, porque no afectaría los microorganismos benéficos. Comprobando uno de los supuestos de punto de partida de este proceso de investigación.

Estudios moleculares del efecto de los aceites esenciales de orégano sobre la microbiota intestinal

La evaluación de la eficiencia de los aceites esenciales debe distinguir entre los estudios *in vitro* de los estudios *in vivo*. En este aspecto se argumenta que las condiciones del tracto intestinal son complejas y variables y que en la mayoría de los casos, los aceites esenciales interactúan con metabolitos primarios y secundarios presentes en los recursos alimenticios (Wenk, 2003). En general, los estudios *in vitro* exceden el número de estudios *in vivo* sobre actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, y la información es fragmentaria en este último caso sobre la eficiencia de aplicación de los aceites esenciales en nutrición animal. Este aspecto es desconocido para el caso del carvacrol y el timol, y en este sentido es difícil asociar la actividad antibacterial *in vitro* respecto a *in vivo*, debido a los efectos de dilucion durante el pasaje de la ingesta, en estas condiciones, la concentración de AEO en la digesta no es igual a la concentración mínima inhibitoria en la que se evalúan *in vitro*.

A pesar de que el objetivo inicial fue monitorear mediante técnicas moleculares grupos bacterianos específicos tanto benéficos como patógenos, los últimos avances en la biotecnología y la bioinformática, nos permitieron profundizar y describir de una manera más acertada el microbioma del tracto gastrointestinal por efecto de la inclusión de AEO. En un primer experimento, se monitoreó el efecto de diferentes quimiotipos de aceites esenciales de orégano bajo un nivel constante en la dieta. Mediante DGGE se pudo establecer que los pollos de engorde tratados con AEO se agruparon en un cluster diferente (baja similitud) respecto a los pollos no tratados. Otros estudios han observado efectos similares por efecto de mezclas comerciales de extractosde plantas (Hume et al., 2006). Sin embargo, esta técnica no permite determinar qué grupos bacterianos se modificaron con la inclusión de AEO.

Con base en los resultados de este y otros experimentos no reportados, se planteo un estudio para determinar el nivel óptimo de inclusión de AEO rico en timol, no evaluado antes como aditivo nutraceutico en dietas para pollos de engorde. Se monitoreó la microflora intestinal de ciegos por el método de pirosecuenciación, el cual permitió conocer que el mayor porcentaje de las bacterias no se encuentran clasificadas. En este contexto se prefiere el término OTUs que traduce unidades taxonómicas operacionales, se sostiene que llevar la clasificación taxonómica de seres vivos superiores al dominio bacteria, no es lo más conveniente. Este estudio metagenómico del microbioma de los ciegos de pollos de engorde y los acercamientos mediante parámetros de diversidad alfa y beta, permitieron establecer la comoplejidad del sistema gastro intestinal, determinar grupos bacterianos no reportados por métodos microbiológicos clásicos y determinar con mayor claridad el efecto de los AEO y del reto con coccidia. Así como se observó con el comportamiento productivo, los AEO acturaron de manera diferente en pollos retados y no retados. Grupos bacterianos como *Gemella*, *Pasterella* y *Enterobacter*, solo se encontraron en el ciego de pollos retados con coccidia y no tratados con AEO. La suplementación con AEO a pollos retados con ooquistes vacunales de coccidia, permitió manipular las poblaciones microbianas hacia una mayor similitud con el tratamiento control, no retado y no suplementado con AEO. Por el contrario, la suplementación con AEO en pollos no retados, modificó la microflora intestinal hacia una similitud con respecto a los pollos retados y no tratados con AEO, estos dos grupos presentaron la mayor proporción de Streptococcacea (familia), *Faecalibacterium* (género), Pseudomonales (orden) y *Salmonella* (género). A diferencia de los resultados *in vitro*, la suplementación con AEO no afectó la proporción de *Escherichia* en pollos retados, pero el porcentaje de *Salmonella* se redujo mas no se logró igualar al grupo control, el cual fue negativo para *Salmonella*.

Es importante tener en cuenta que la microbiota intestinal es muy extensa y su monitoreo a partir de pequeñas muestras sólo reflejan puntos específicos en el espacio-tiempo, los cuales no son suficientes para explorar en su totalidad este microbioma (Sloan et al., 2007). Se require entonces de un monitoreo más representativo y a una escala comercial que permita establecer las asociaciones con indicadores del desempeño productivo de los pollos de engorde. Los estudios adelantados en humanos, donde relacionan la composición microbiológica con el metabolismo y disturbios

metabólicos (Zhang et al., 2009) pueden servir de base para establecer con precisión qué grupos bacterianos y qué participación realizan en el mantenimiento de la salud, el metabolismo y la producción de los pollos de engorde.

El nivel de conocimiento que actualmente se tiene del microbioma intestinal es muy bajo, si consideramos que en el presente estudio se lograron obtener 107.774 lecturas y 51.224 OTUs (muy superior a otros estudios) y considerando que las inferencias entre salud y enfermedad en el tracto gastrointestinal aún giran en torno a bacterias que se han cultivado tradicionalemente en laboratorio y que representan una mínima fracción del perfil microbiológico, nos conduce a concluir que es necesario establecer asociaciones entre estos grupos microbianos encontrados (convencionales y no convencionales) con el metabolismo, la fisiología y el comportamiento productivo de los animales.

Respuesta productiva de los aceites esenciales de orégano en pollos de engorde

La prohibición de los antibióticos promotores de crecimiento ha incrementado el interés por alternativas que estabilicen el crecimiento y la salud de los pollos de engorde durante el ciclo productivo. Los cambios en la dieta estimulan el desarrollo de una microflora autóctona por parte del huésped y es tal vez una vía importante para reemplazar los APC (Williams et al., 2001). Adicionalmente, los aditivos naturales como los aceites esenciales no dañan el ambiente con residuos y son también ponderados para reemplazar los APC (Allan y Bilkei, 2005). Los aceites esenciales de orégano (AEO) en sus componentes bioactivos timol y carvacrol han sido categorizados con una prioridad superior en los diferentes estudios realizados. Los escasos estudios llevados a cabo *in vitro* han sido contradictorios y objeto de una crítica importante (Pfirter, 2003).

Un aspecto fundamental a considerar en el uso de aceites esenciales de orégano en términos de la eficiencia de uso y de dosificación están relacionados con los procesos de emulsificacion, la formación de complejos con proteínas, el pH y las condiciones anaeróbicas del tracto intestinal (Juven et al., 1994), lo cual también limita la comparación de los estudios *in vitro*, con los hallazgos *in vivo*. En este aspecto, Burt (2004) plantea que las condiciones físicas de eficiencia de uso de los aceites esenciales

pueden mejorarse a bajas temperaturas, bajo pH y baja oferta de oxígeno. De otra parte, los aceites esenciales de orégano podrían ser absorbidos en la parte proximal del intestino y consecuentemente la actividad antimicrobiana en el tracto distal parecería limitada, siendo necesaria la investigación con agentes retardantes para una mayor efectividad de los aceites esenciales en aves. En el caso particular del timol, Kohlert, et al., (2002) plantea que éste se absorbe en la parte alta del intestino debido a que es una pequeña molécula, con propiedades lipofilicas, así como lo es el carvacrol.

Cuando se evaluó la inclusión de 200 ppm de AEO cultivados en Sabana de Bogotá sobre la digestibilidad ileal, micrometría del epitelio intestinal y su relación con el comportamiento productivo de pollos de engorde, se encontró un comportamiento inverso respecto al contenido de carvacrol en el aceite esencial y una relación positiva con relación al timol. Previos estudios ya han reportado un efecto toxico para el carvacrol mas no para el timol (Lee et al., 2003). Sin embargo, los efectos de aceites esenciales provenientes de *O. majorana* en un sistema de alimentación de pollos de engorde, no han sido reportados. Los resultados de las investigaciones con AEO se circunscriben a explicar sus efectos en función del contenido de carvacrol y su actividad antibacteriana (Giannenas et al., 2003). Los resultados del presente estudio, sugieren otros efectos funcionales no asociados directamente con la actividad bactericida contra bacterias patógenas. *O. majorana*, una especie rica en sabineno y sus derivados, con muy baja actividad antibacterial, fue la que produjo el mejor comportamiento productivo en los pollos de engorde. Es posible que otras propiedades funcionales sobre la fisiología también puedan contribuir al efecto promotor de crecimiento. Sin embargo, al final del ciclo, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los grupos suplementados con antibióticos y con *O. majorana*, respecto al grupo control, para concluir una vez más que este tipo de promotores de crecimiento no se expresan en condiciones experimentales, como ya otros estudios lo han concluido (Lee et al., 2003). En la literatura se encuentra que los efectos de los AEO aún permanecen controversiales, en algunos casos mejoraron el crecimiento de los pollos (Giannenas et al., 2003), mientras que en otros casos no se encontraron efectos sobre el crecimiento de los pollos de engorde (Botsoglou et al., 2002); la diferencia está en que mientras que Giannenas et al., evaluaron el efecto de los OEO bajo condiciones de reto, Botsoglou et al., los evaluaron en condiciones experimentales. Se recomienda entonces, evaluar los

AEO en condiciones menos limpias y con algún tipo de reto que simule las condiciones comerciales, como ha sido descrito previamente.

Este estudio también permitió comprobar el posible papel de la homeostasis del tracto gastro-intestinal en la incidencia del síndrome ascítico, todos los grupos tratados con AEO y AB, redujeron significativamente la mortalidad por ascitis, lo cual requiere profundizar a este nivel en estudios posteriores. Algunos autores lo explican como un posible efecto antiinflamatorio, modulador del sistema inmune y una mayor eficiencia metabólica en el tracto gastro-intestinal y menor demanda de oxígeno y por consiguiente menor gasto cardiaco y susceptibilidad al síndrome ascítico (Chichlowski et al., 2007).

A pesar de que el monitoreo de la comunidad microbiológica por DGGE reveló la conformación de dos clusters principales, pollos tratados con AEO y pollos no tratados, estos efectos no estuvieron asociados con el comportamiento productivo de los pollos de engorde. Se observó también una atenuación de la diferencia en el perfil microbiológico del intestino anterior respecto al intestino posterior de los pollos por efecto de la inclusión de AEO. Sin embargo, el perfil microbiológico por DGGE no permite identificar los grupos bacterianos de forma directa, por lo que no es posible determinar qué grupos bacterianos fueron afectados por la suplementación con AEO.

Considerando los resultados obtenidos en una primera aproximación, un nuevo desarrollo del tema permitió plantear y definir niveles de inclusión que optimicen el peso corporal a partir de *L. origanoides*, una especie con un perfil composicional diferente a las especies tradicionalmente estudiadas, rica en timol. En este sentido se comprobó que los AEO atenuaron los efectos negativos del reto con ooquistes vacunales de coccidia, pero no permitieron igualar el peso corporal de los grupos control, no retados. La conversión de alimento se mantuvo mejor con la inclusión más baja de AEO. Lo más relevante de este estudio fue comprobar que el nivel óptimo de inclusión de AEO depende de las condiciones experimentales, cuando se trabaja en pollos retados, el nivel casi que se duplica respecto a condiciones normales. Se establecieron los umbrales superiores dentro de los cuales los AEO pueden ser tóxicos (200 y 300 ppm) porque deprimieron el peso corporal de los pollos de engorde. En general, el conglomerado de investigaciones realizadas sugiere un efecto sobre el peso corporal promedio de +54 g, -152 g en el consumo acumulado de alimento y -0,07 en la conversión alimenticia, con coeficientes de

variación de 73,2, 111,9 y 37,8%, con lo que se concluye que la respuesta más consistente a la suplementacion de aceites esenciales fue para la conversión de alimento y como consecuencia, una menor relación del ingreso neto parcial también fue observada en los experimentos realizados.

Para terminar, hay un tema fundamental y crítico, la domesticación y el cultivo sistemático del orégano es un eslabón que ofrece ventajas sobre el cultivo natural para la producción de aceites esenciales tales como: evita las mezclas y adulteraciones por otra taxonomía botánica, promueve un mejor control de los volúmenes cultivados, permite seleccionar quimioticpos con características deseables, especialmente de calidad y controla la influencia de la historia del material vegetal y su manejo postcosecha. Franz y Novak (1997) muestran una estrategia domesticación que puede ser aplicada en el futuro a los estudios de orégano, estrategia que se resume en la tabla 1.

Conclusiones y trabajo futuro

Los sistemas de producción animal se construyen en la actualidad bajo la orientación de importantes fuerzas sociales y éticas que delinean diferentes alternativas de producción industrial en escenarios de calidad total. Este estudio realizado en pollos de engorde entrega una base de acervo científico y tecnológico sobre los AEO, en el marco de soluciones estructurales sostenibles a la problemática de uso de aditivos alimenticios convencionales, como los promotores del crecimiento.

En general se puede indicar que el orégano es un ejemplo clásico de estudio de la biodiversidad con diferentes expresiones de quimiotipos, en dos géneros que cubren la mayoría de investigaciones realizadas a nivel mundial: *Origanum* y *Lippia*. Este estudio demostró una concentración constante relativa en los metabolitos dominantes dentro de cada quimiotipo analizado: el metabolito dominante para *O. vulgare H* fue carvacrol, mientras que en *Lippia origanoides* fue el timol y en *O. majorana* fue sabineno y sus derivados.

La actividad antibacteriana de los AEO estuvo asociada al contenido de carvacrol y timol; sin embargo, los resultados sugieren otros efectos funcionales no asociados directamente con la actividad bactericida contra bacterias patógenas, ya que el *O. majorana*, una especie con muy bajas concentraciones de carvacrol y timol, produjo el

mejor comportamiento productivo en los pollos de engorde. De otra parte, la poca asociación de la actividad antibacteriana *in vitro* con respecto a *in vivo*, sugeriría efectos de la dilución durante el pasaje de la ingesta y en estas condiciones la concentración de AEO en la digesta no sería equiparable a la concentración mínima inhibitoria de las evaluaciones *in vitro*.

La expresión de los AEO depende de las condiciones ambientales sobre las cuales se realizan los estudios, en batería o en piso, siendo más relevante la evaluación bajo condiciones de reto que simulen las condiciones comerciales de producción tropical donde predominan sistemas abiertos, con unas altas cargas bióticas del entorno. Adicionalmente, esta investigación comprobó que el nivel de utilización de AEO difiere en las características de respuesta a estas condiciones ambientales.

La respuesta más consistente desde el punto de vista productivo a la suplementación de AEO fue para la conversión de alimento, lo cual se reflejó en una mayor productividad en ciclos comerciales de producción mediante la evaluación del ingreso neto parcial; sin embargo, bajo las condiciones del presente estudio y con los niveles de inclusión de AEO utilizados, las variedades de orégano ricas en carvacrol presentaron efectos negativos, sobre el desempeño productivo del pollo de engorde.

Las comunidades microbianos fueron caracterizadas mediante DGGE, estableciéndose las diferencias generadas por la utilización de AEO; sin embargo, esta técnica no permite determinar qué grupos bacterianos específicos se modificaron con la inclusión de AEO. En este contexto, un estudio metagenómico del microbioma de los ciegos de pollos de engorde y los acercamientos mediante parámetros de diversidad alfa y beta, permitieron establecer la complejidad del sistema gastrointestinal en los pollos de engorde y determinar grupos bacterianos no reportados por métodos microbiológicos clásicos. Este acercamiento metodológico permitió dar una mayor claridad al efecto de los AEO en condiciones de reto. En el corto plazo es necesario establecer asociaciones entre estos grupos microbianos encontrados (convencionales y no convencionales) con el metabolismo, la fisiología y el comportamiento productivo de los pollos de engorde.

La suplementación con aceites esenciales de *Lippia Origanoides* en pollos de engorde retados permitió minimizar algunos grupos microbianos en los ciegos, pero

produjo similares modificaciones en el perfil microbiológico de los ciegos de pollos no retados respecto a pollos retados con ooquistes vacunales de coccidia. El efecto tóxico del carvacrol y el timol *in vitro* sobre los microorganismos patógenos podría presentarse *in vivo* en las células del epitelio intestinal cuando se utilizan altos niveles de inclusión de AEO, produciendo un bajo desempeño productivo de los animales. Igualmente, la suplementación debe enmarcarse en un monitoreo y avance en el conocimiento de la dinámica de asociación de las poblaciones microbianas del TGI, con la expresión metabólica y funcional del pollo de engorde.

A pesar de la importancia comercial que han logrado las variedades de orégano ricas en carvacrol, este estudio demuestra la necesidad de explorar las oportunidades de industrialización de variedades ricas en timol como *Lippia origanoides* Kunth, nativo de Colombia. En este sentido, se debe elaborar un portafolio y conocer otras propiedades funcionales de los AEO con beneficios no solo para la calidad del producto, carne de pollo, sino también sobre la salud y expresión funcional del animal.

Tabla 1. Estrategia de domesticación y producción a escala del orégano

Estudios en el hábitat natural: Botánica, suelo, clima, tipo de crecimiento, distribución natural y propagación, enemigos naturales, como plagas y enfermedades	GPS para una localización exacta del nicho natural de producción
Colección de las plantas naturales en crecimiento y semillas: establecimiento una colección de germoplasma, su conservación ex-situ, la investigación fitoquímica(caracterización)	
Propagación de la planta: vegetal o por semillas, cultivo en invernadero, aplicación de propagación *in vitro*	Instrumentación biotecnológica *in vitro*
Mejoramiento genético: variabilidad, selección, mejoramiento, investigación fitoquímica, biotecnología *in vitro*	Técnicas biotecnológicas *in vitro*
Manejo agronómico del cultivo: lugares de crecimiento, fertilización, cultivo de mantenimiento y técnicas de cultivo	
Problemas fitosanitarios: plagas y enfermedades	Técnicas biotecnológicas *in vitro*
Duración del cultivo: cosecha, manejo postcosecha control fito químico de la cosecha producida	Técnicas de procesamiento, uso de energías alternativas (solar)
Evaluación económica y cálculos de balance	Técnicas de optimización del proceso de innovación

Fuente: Adaptado de Franz y Novak,1997

Bibliografía

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. And Chinou, B.I. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species. J. Agric. Food Chem. 49: 4168-4170.

Allan, P. and Bilkei, G. 2005. Oregano improves reproductive performance of sows. Theriogenology. 63: 716–721.

Baratta, M. T.; Dorman, H. J. D.; Deans, S. G.; Biondi, D. M.; Ruberro, G. 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. J Essent Oil Res. 10: 618–627.

Baser, K.H.C. 2002. The Turkish Origanum species. In Oregano. The Genera Origanum and Lippia, S.E. Kintzios (ed.), New York: Taylor & Francis. pp. 109–126.

Botsoglou, N. A., P. Florou-Paner, E. Christaki, D. J. Didry, N. L. Fletouris, and A. B. Spais. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. Br. Poult. Sci. 43: 223- 230.

Burt, S. 2004: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223–253.

Chichlowski M; J Croom; B W McBride; L Daniel. 2007. Direct-fed microbial PrimaLac and salinomycin modulate whole-body and Intestinal mucosal cytocine production in broiler chick. Poult. Sci. 86: 1100-1106.

Dorman, H. J. D. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. App. Microbiol. 88: 308–316.

Fischer, U., Ch. Franz, R. Lopez, E. Poll. 1996. Variability of the essential oils of Lippia graveolens HBK from Guatemala. In Essential Oils: Basic and

Applied Research, Ch. Franz, A. Mathe, and A. G. Buchbauer (eds), Carol Stream: Allured Publishing. pp. 266–269.

Franz, Ch. and Novak, J. 1997. Breeding of Origanum sp., In Proc. IPGRI Workshop Padulosi S (ed.), Oregano, pp. 50–57.

Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, E. Christaki, N.A. Botsoglou, and A.B. Spais. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with Eimeria tenella. Arch. Anim. Nutr. 57: 99-106.

Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86: 985–990.

Helander Ilkka M., Hanna-Leena Alakomi, Kyo¨sti Latva-Kala, Tiina Mattila-Sandholm, Irene Pol, Eddy J. Smid, Leon G. M. Gorris and Atte von Wright. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. J. Agric. Food Chem. 46: 3590-3595.

Hume, M. E, S. Clemente-Hernández, and E. O Oviedo-Rondón. 2006. Effects of feed additives and mixed Eimeria species infection on intestinal microbial ecology of broilers. Poult. Sci. 85: 2106-2111.

Grassi, P., J. Novak, H. Steinlesberger, and Ch. Franz. 2004. A direct liquid, non-equilibrium solid-phase microextraction application for analysing chemical variation of single peltate trichomes on leaves of Salvia offi cinalis. Phytochem. Anal. 15: 198–203.

Johnson, C.B, A. Kazantzis, M. Skoula, U. Mitteregger, and J. Novak. 2004. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. Phytochem. Anal. 15: 286–292.

Lee[1], K.-W., H. Everts, H. J. Kappert, K.-H. Yeom, and A. C. Beynen. 2003. Dietary Carvacrol Lowers Body Weight Gain but Improves Feed Conversion in Female Broiler Chickens. J. Appl. Poult. Res. 12: 394-399.

Lee[2], K.-W., H. Everts, H. J. Kappert, M. Frehner, R. Losa and A. C. Beynen. 2003. Effect of dietary essential oils on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br. Poult. Sci. 44: 450–457.

Juven, B. J.; Kanner, J.; Schved, F.; Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bact. 76: 626–631.

Kohlert, C.; Schindler, G.; Ma¨ rz, R. W.; Abel, G.; Brinkhaus, B.; Derendorf, H.; Gra¨ fe, E. U.; Veit, M. 2002. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. J. Clinical Pharmac. 42: 731– 737.

Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. J.; Nychas, G. J. E. 2001: A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microb. 91: 453–462.

Pfirter, H. P., 2003: AML-Verbot: Alternative Futterzusatzstoffezur eistungsverbesserung. SchriftenreiheInstitut fu¨ r Nutztierwissenschaften, ETH Zu¨ rich,Band 24: Gesunde Nutztiere. Heutiger Stellenwert derFutterzusatzstoffe in der Tiererna¨hrung. 24: 63–71.

Rhayour, K.; Bouchikhi, T.; Tantaoui-Elaraki, A.; Sendide, K.; Remmal, A. 2003: The mechanism of bactericidal action of oregano and colve essential oils and of their phenolic major components on Escherichia coli and Bacillus subtilis. J ESSENT OIL RES. 15: 356–362.

Schmiderer, C., P. Grassi, J. Novak, M. Weber, and C. Franz. 2008. Diversity of essential oil glands of clary sage (Salvia sclarea L., Lamiaceae). Plant Biol. 10: 433–440.

Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. J. Agr. Food Chem. 44: 1202–1205.

Skoula M. and Harborne J. 2002.The taxonomy and chemistry of Origanum. Genus. *In*: Spiridon E (ed.). *Oregano, the genera Origanum and Lipia.* London and New York: Taylor & Francis; pp 127-150.

Sloan WT, Woodcock S, Lunn M, Head IM, Curtis TP. 2007. Modeling taxa-abundance distributions in microbial communities using environmental sequence data. Microbial Ecol 53: 443–455.

Vattem DA , Mihalik K, Crixell SH, McLean RJC. 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia. *78*: 302–310.

Wenk, C., 2003. Herbs and botanicals in the nutrition of monogastric animals. 9. Syposium ‘‘Vitamine und Zusatzstoffe in der Erna¨hrung von Mensch und Tier am 24.und 25.09. Jena/Thu¨ ringen, 45–60.

Williams, B. A.; Verstegen, M. W. A.; Tamminga, S. 2001. Fermentation in the large intestine of singlestomached animals in relationship to animal health. Nutr. Res. Rev. 14: 207–227.

Zhang, H. J., K. DiBaise, A. Zuccolo, D. Kudrna, M. Braidotti, Y. Yu., P. Parameswaran, M. D. Crowell, R. Wing, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown. 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. PNAS. ww.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0812600106 PNAS. 106: 2365–2370.