

EFFECTO DE LA DIETA SOBRE LA FLORA MICROBIANA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE AVES

Juha Apajalahti y Anu Kettunen
Danisco Innovation, Enteromix Research
Sokeritehtaantie 20, FIN-02460, Kantvik, Finland

1.- INTRODUCCIÓN

La microflora intestinal es una parte integral del sistema digestivo de todos los animales. Las bacterias gastrointestinales obtienen la mayor parte de su energía para reproducción y crecimiento a partir de los componentes de la dieta que son o bien resistentes al ataque de los fluidos digestivos, o bien absorbidos tan lentamente que las bacterias pueden competir con éxito por ellos. Las especies bacterianas difieren en relación a sus preferencias de sustratos y a sus necesidades para el crecimiento. Por ello, la composición química y la estructura de la digesta determina ampliamente la distribución de la comunidad microbiana en el tracto intestinal (Savory 1992; Wagner and Thomas 1987). La comunidad bacteriana en un momento de tiempo dado refleja, entonces, la capacidad de cada grupo bacteriano para competir frente a otros grupos y frente al sistema de defensa del huésped en unas determinadas condiciones físicas y químicas del medio. Viceversa, la habilidad del sistema digestivo para digerir y absorber nutrientes es, en parte, dependiente de la distribución de especies y de la población total de microorganismos residentes. Por ello, los cambios en la composición de la dieta o en la densidad de nutrientes pueden tener efectos muy importantes sobre la población microbiana intestinal (Gibson et al., 1996; Hillman, 1999; Reid y Hillman, 1999), lo que a su vez influye en la habilidad de los animales para digerir y absorber nutrientes.

Es por tanto posible cambiar la comunidad microbiana de bacterias patógenas a no-patógenas mediante cambios en la dieta y, consecuentemente, en la dinámica intestinal. Determinadas especies pueden ser estimuladas por ciertos componentes de la dieta tales como los probióticos (fibra dietética y oligosacáridos) y por los componentes estructurales de los piensos compuestos. Estos componentes escapan de los procesos digestivos del huésped, pero son fácilmente disponibles para el metabolismo de estos microorganismos. Los probióticos, bacterias vivas suministradas con el alimento, son otro grupo de productos

que se están estudiando para mejorar la salud del tracto gastrointestinal, pero sólo son efectivas cuando sus necesidades de crecimiento son cubiertas. El suministro de prebióticos no será efectivo sin la presencia de las bacterias beneficiosas, mientras que los probióticos no serán efectivos si el medio en el que se introducen es desfavorable. De hecho, un producto simbiótico que contenga simultáneamente una estirpe probiótica y un prebiótico que favorezca el crecimiento de esa estirpe puede ser una buena solución en muchos casos.

El estatus microbiano del tracto gastrointestinal de los pollos depende no sólo de la dieta sino también de las condiciones del medio. Camas sucias y otros parámetros de manejo afectan a la flora microbiana del pollo tanto directamente, proporcionando una fuente continua de bacterias, como indirectamente, al debilitar la condición física y las defensas de las aves.

En la actualidad hay una preocupación creciente sobre patógenos alimenticios que se transmiten desde los animales de granja hacia la población humana, incluso en los países más desarrollados. Debido a la ausencia de estrategias alternativas, la mayoría de los intentos para controlar la microflora gastrointestinal en pollos se han hecho hasta ahora sobre la base del uso de antibióticos de amplio espectro. Sin embargo, la reciente y creciente preocupación por la diseminación de genes de resistencia a antibióticos ha conducido a la prohibición del uso profiláctico de muchos antibióticos. La utilización de ingredientes alimenticios que favorecen al crecimiento de la flora intestinal beneficiosa, así como la introducción directa de probióticos, se han demostrado efectivos en algunos casos y son utilizados en la práctica para manipular la composición de la flora microbiana del tracto digestivo (Cresci *et al.* 1999; Garriga *et al.* 1998; Gusils *et al.* 1999; Hock *et al.* 1997; Izat *et al.* 1990; Jin *et al.* 1998). Sin embargo, ninguno de estos productos alternativos desarrollados hasta ahora ha proporcionado una solución general que resulte efectiva en una amplia variedad de condiciones. Es posible que el desarrollo de estrategias de manejo alternativos haya sido ralentizado por la falta de técnicas analíticas prácticas para monitorizar la composición de la flora, lo que se traduce en una falta de conocimientos sobre el papel de las diferentes especies bacterianas. El rápido desarrollo que se ha producido recientemente de herramientas avanzadas de diagnóstico puede esperarse que aumente nuestros conocimientos y que acelere el desarrollo de nuevas estrategias de manejo.

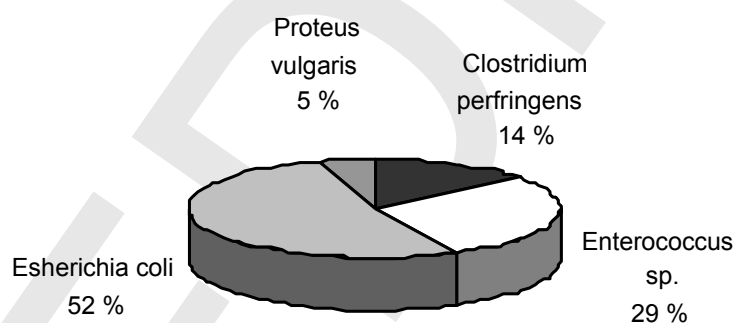
2.- MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA MICROFLORA GASTROINTESTINAL

Algunos estudios sobre la microflora en varias especies animales y en una diversidad de hábitat sugieren que sólo una fracción de la flora microbiana se captura eficientemente cuando se usan técnicas clásicas de cultivos microbianos (Amann *et al.* 1995; Felske *et al.* 1998; Fritsche *et al.* 1999; Hanson and Hanson 1996; Holben *et al.* 1998; Ohkuma and Kudo 1996). No obstante, métodos que usan condiciones selectivas son muy eficientes para descubrir algunas poblaciones minoritarias, tales como algunas especies conocidas de patógenos. Es importante tener en cuenta que las técnicas de cultivo

selectivo en placas pueden detectar poblaciones microbianas a concentraciones mucho más bajas que cualquiera de los métodos basados en ADN conocidos en la actualidad. Por tanto, estas técnicas no deberían ser subvaloradas cuando se usan y se interpretan correctamente. Por el contrario, estas técnicas clásicas probablemente nunca capturan el total de la comunidad microbiana en hábitats anaeróbicos complejos, tales como el tracto gastrointestinal de las aves.

En uno de nuestros estudios, los pollos parecían sufrir enteritis necrótica. Las bacterias ileales fueron cultivadas en agar DRCM (medio diferencial reforzado para clostridium), considerado generalmente selectivo para clostridios. Las colonias que crecían en el medio fueron muestreadas al azar y analizadas posteriormente por secuenciación del 16S. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base pública de datos ribosomal 16S (Maidak et al., 2001) y se encontró una buena correspondencia para todas las secuencias comparadas. Encontramos que sólo un 14% de las colonias que crecían sobre este medio “selectivo” fueron de hecho clostridium. Las mayores poblaciones encontradas fueron cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp (figura 1).

Figura 1.- Abundancia relativa de bacterias ileales creciendo sobre agar diferencial RCM



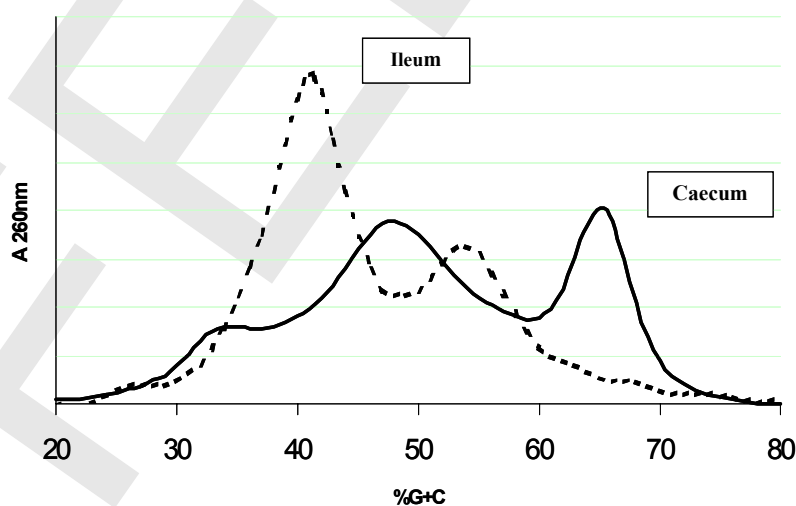
Cada medio de cultivo utilizado para la determinación de patógenos o de otras especies bacterianas definidas debería testarse en cuanto a su selectividad real tal como se describe en el párrafo anterior. En el estudio mencionado, los valores más representativos de *C. perfringens* sólo se encontraron en pollos inoculados con *E. maxima*. Este resultado concuerda con otros anteriores encontrados en nuestro laboratorio y sugiere que los clostridios son un factor que predisponen a la aparición de la enteritis necrótica (Al-Sheikhly and Al-Saieg 1980; Broussard et al. 1986; Jatila et al. 2000; Williams et al. 1999).

Hay pocos métodos disponibles para monitorizar el total de la comunidad microbiana del tracto digestivo. Las bacterias suficientemente grandes pueden observarse por microscopía de fluorescencia, pero sólo algunas de ellas pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio. La mayoría de las bacterias que crecen en una comunidad tan compleja dependen de factores de crecimiento suministrados por otros microorganismos o de secreciones de los tejidos del huésped. Debido a la complejidad de estas necesidades es típico que sólo menos del 10% de las bacterias que viven en el intestino puedan ser cultivadas en condiciones de laboratorio. Como consecuencia, la mayoría de los trabajos y

conclusiones obtenidos hasta la actualidad reflejan sólo cambios de miembros minoritarios de la microflora. Todos los patógenos conocidos actualmente se encuentran en este grupo minoritario cultivado fácilmente. Muchas enfermedades cuya causa es hoy desconocida pueden tener un agente causal entre los microorganismos todavía desconocidos por ser difícilmente cultivables.

Nuestro laboratorio está usando actualmente técnicas basadas en ADN para analizar las comunidades microbianas del tracto digestivo. Esto significa que el ADN del total de la comunidad bacteriana intestinal se recupera usando una combinación de métodos físicos, químicos y enzimáticos (Apajalahti *et al.* 1998; Apajalahti *et al.* 2001). Hemos diseñado este proceso de forma que no discrimine ningún tipo de bacteria de forma que la muestra represente el total y no una parte de la comunidad bacteriana. Cuando se desee una determinación más específica deben usarse por el contrario métodos discriminantes. En la actualidad estamos usando técnicas basadas en el contenido de guanina + citosina del ADN bacteriano, hibridación, reacción de la cadena de polimerasa con primers específicos y secuenciación del ADN ribosomal 16S para aumentar la especificidad (Apajalahti *et al.* 1998; Apajalahti *et al.* 2001; Apajalahti *et al.* 2002; Holben *et al.* 2002). Es importante tener en cuenta que ninguna técnica que muestre el perfil de la comunidad bacteriana total puede al mismo tiempo ser específica para alguna especie en particular. Si ambos aspectos son necesarios debe utilizarse más de un método de determinación. La figura 2 muestra los perfiles típicos de proporción G+C de las bacterias ileales y cecales de pollos. La posición de los picos de absorción en el eje de abscisas caracteriza los tipos de bacterias predominantes.

Figura 2.- Análisis de la flora microbiana en ileon y ciego de pollos en base al perfil G+C



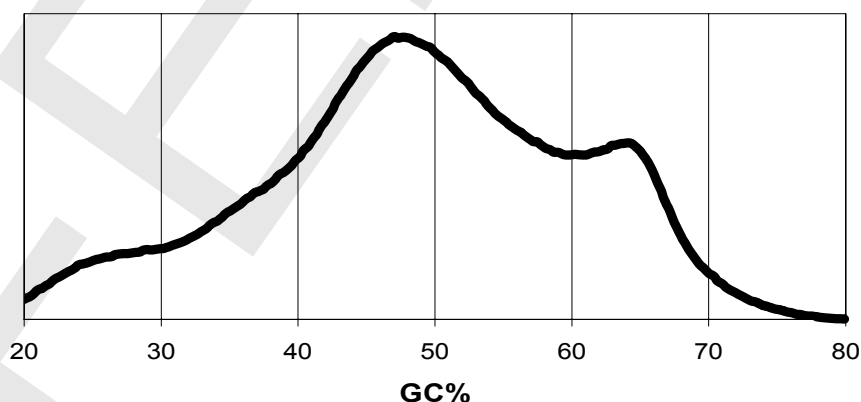
3.- BACTERIAS EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE POLLOS

Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio medidos por cultivo independiente de flujo citometrial muestra que sólo un día después del nacimiento la densidad de

bacterias en el íleon y ciego de los pollos alcanza valores de 10^8 y 10^{10} por gramo de digesta, respectivamente. El número de microorganismos sobrepasa a 10^{11} por gramo de contenido cecal y 10^9 por gramo de contenido ileal durante los tres primeros días después del nacimiento y permanece relativamente estable durante los siguientes 30 días (Rautonen et al., presentado a publicación, (Mead and Adams 1975). El mantenimiento de tal población en condiciones anaeróbicas requiere una cantidad significativa de sustrato: alrededor de un 10-20% de los carbohidratos y proteína del alimento. La mayor parte de las bacterias se encuentran del íleon en adelante, lo que significa que los nutrientes que permiten su crecimiento deben escapar a la digestión intestinal del huésped.

El tracto gastrointestinal de los pollos aloja numerosas especies bacterianas. Los recientes desarrollos en el análisis de la comunidad microbiana por métodos basados en ADN han arrojado nueva luz sobre la microbiología del tracto gastrointestinal de muchas especies animales (Suau et al., 1999; Apajalahti et al., 2001; Kleessen et al., 2001; Apajalahti et al., 2002; Holben et al., 2002). En una encuesta que hemos realizado sobre bacterias intestinales, hemos aplicado tanto la proporción de G+C como la secuenciación de ADNr 16S. El uso de estos métodos en combinación ha hecho posible crear una base de datos que describen las principales bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de pollos. La figura 3 muestra la mitad de los perfiles de G+C de comunidades bacterianas de acción de diferentes partes del mundo analizados en nuestro laboratorio ($n = 500$). Esta imagen del perfil bacteriano muestra que las bacterias con una proporción G+C próximo a 47 son las de mayor abundancia global relativa, seguidas por aquellas en las que la proporción G+C es de alrededor de 65.

Figura 3.- Media global de la proporción G+C de la comunidad de bacterias cecales de pollos ($n = 500$)

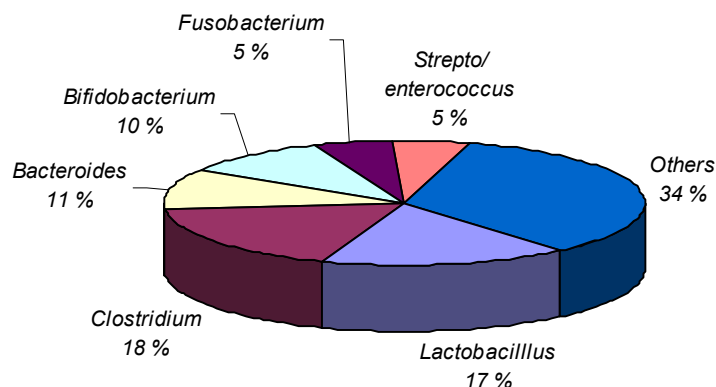


Los perfiles G+C no permiten identificar las especies o cepas microbianas. Por tanto, hemos amplificado una región variable del ADNr 16S por PCR usando primers de todos los organismos conocidos (Apajalahti et al. 2001; Apajalahti et al. 2002; Holben et al. 2002). Después de clonarlos en *E. coli*, los fragmentos representativos de ADN fueron secuenciados y analizados comparativamente. Este análisis filogenético global reveló la presencia de alrededor de 200 especies microbianas con diferentes secuencias. La definición de especies y géneros no está del todo clara, pero a juzgar por las distancias

filogenéticas de algunas especies o géneros bien estudiadas, estos resultados parecen indicar que existen alrededor de 65 grupos de niveles de géneros de bacterias.

La figura 4 muestra los géneros de bacterias más abundantes presentes globalmente en el tracto gastrointestinal de pollos. La abundancia del género *Clostridium*, 18% de todas las bacterias cecales, es notable. Sin embargo, la taxonomía de los clostridios no está resuelta y este género es muy heterogéneo. Por ejemplo, *C. perfringens* no está relacionado con la mayor parte de los miembros del género que habitan en el tracto gastrointestinal de los pollos. La encuesta mostró que los nombres de las bacterias sólo deberían usarse como etiquetas, sin indicar un parentesco real. La mayoría de las bacterias en el tracto gastrointestinal de los pollos parecen representar especies diferentes a las depositadas en las bases de datos públicas de secuencias (Figura 4).

**Figura 4.- Principales géneros de bacterias en el ciego de pollos
(Basado en secuenciación ADNr 16S)**



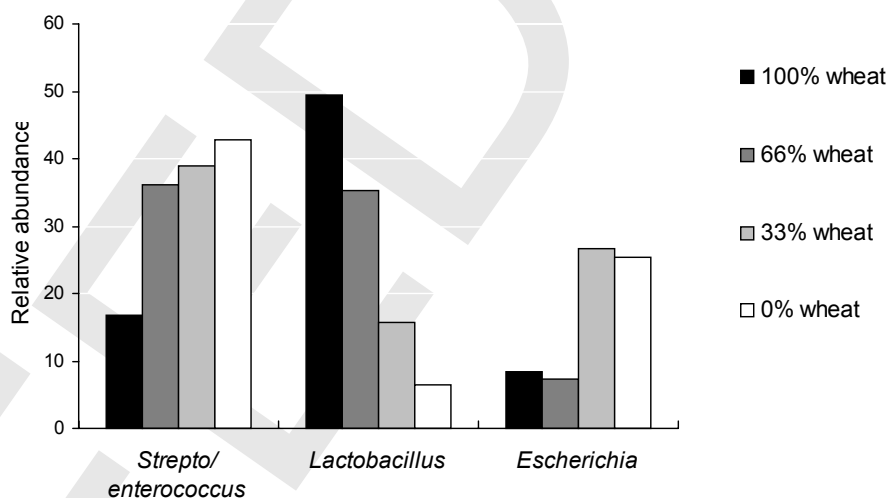
4.- EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA MICROFLORA GASTROINTESTINAL

Con la inclusión de antibióticos, los efectos de la dieta y de las prácticas de manejo sobre la estructura de la comunidad microbiana se reducen. Ingredientes que aumentan potencialmente el riesgo de problemas sanitarios deben usarse con mayor cuidado en ausencia de antibióticos. El centeno y la cebada, y en menor extensión el trigo, por ejemplo, tienen una calidad nutritiva inferior a la del maíz. La explicación más probable es la presencia de cantidades significativas de arabinosilanos y β -glucanos solubles y viscosos en el centeno y trigo y en la cebada, respectivamente, que reducen de manera importante su velocidad de digestión (Antoniou and Marquardt 1981; Bedford *et al.* 1991; Bedford and Classen 1992; Boros 1998; Campbell *et al.* 1989; Campbell *et al.* 1993; Classen *et al.* 1985; Fengler and Marquardt 1988; Scott *et al.* 1998). Como consecuencia hay una mayor provisión de sustrato para la flora que reside en los últimos tramos del intestino delgado y en el ciego/intestino grueso. La mayor abundancia de sustrato implica un mayor potencial de crecimiento y una mayor densidad bacteriana (entre 100 y 1.000 veces), incluso en el intestino delgado, en dietas basadas en centeno con respecto a las basadas en maíz (Wagner and Thomas 1987). Mientras que el efecto del

centeno es el más extremo, efectos similares pero más atenuados han sido observados cuando se usa trigo o cebada (Hofshagen and Kaldhusdal 1992; Persia *et al.* 1999).

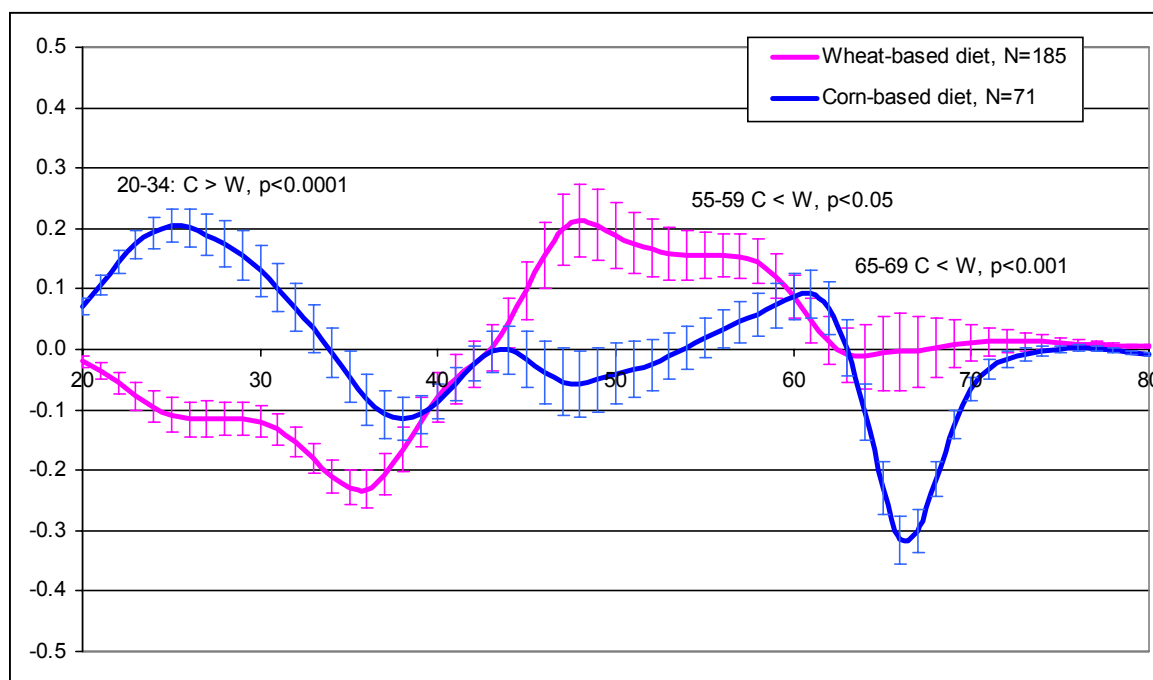
El cereal utilizado en la dieta puede afectar no sólo a la densidad de las bacterias, sino también a la composición de la flora. Hemos estudiado el efecto de incrementar la relación centeno/trigo sobre la abundancia de los tres principales grupos bacterianos: lactobacilos, cocci Gram-positivos (strepto/entero) y *E. coli* en el íleon de pollos y hemos encontrado cambios significativos en la abundancia relativa de estos tres grupos de bacterias. La figura 5 muestra que la disminución de la relación trigo/centeno (desde 100% de trigo hasta 100% de centeno) aumenta significativamente la proporción de *Streptococcus/Enterococcus* y *E. coli*, mientras que la densidad del grupo de *Lactobacillus* cayó dramáticamente. El aumento de la población de strepto/enterococci y coliformes es probable que induzca un estrés adicional sobre los rendimientos y la salud de las aves. *Enterococcus faecium* está considerado como el organismo que más probablemente reduce el crecimiento en pollos (Coates 1986; Fuller *et al.* 1983), posiblemente a través de su interacción no sólo con el sistema inmunitario del huésped sino también a través de su efecto negativo sobre la digestión.

Figura 5.- Efecto de la inclusión de centeno sobre la abundancia de algunos grupos de bacterias en el íleon de pollos



En orden a estudiar el efecto del cereal sobre el perfil de la comunidad bacteriana hemos analizado 256 muestras de ciego de aves alimentadas en base a trigo y maíz. Se utilizó el método proporción G+C y los resultados fueron analizados por técnicas de regresión lineal múltiple para determinar las principales causas de variación. La figura 6 muestra qué tipo de cereal afectó a la composición de la flora microbiana en el ciego. Con respecto al trigo, el maíz favoreció los microorganismos con una proporción G+C baja (20-34) a expensas con las bacterias proporción G+C superior (55-59). Este análisis no revela la identidad de las bacterias pero es posible que el maíz favorezca a los clostridios, enterococos y/o lactobacilos de bajo G+C, mientras que el trigo favorezca a las fuso- y bifidobacterias.

Figura 6.- Perfil medio de la comunidad microbiana cecal en pollos alimentados con dietas basadas en trigo o maíz



En otro estudio se compararon pollos alimentados con dietas basadas en maíz y en granos menos comunes tales como sorgo, cebada, avena y centeno. Las bacterias cecales se recuperaron de la digesta, su ADN fue aislado y las comunidades se analizaron por secuenciación ADNr 16S. El cuadro 1 indica las variaciones significativas en los géneros bacterianos entre los diferentes granos estudiados.

Cuadro 1.- Efecto de diferentes granos sobre la abundancia de algunos componentes de la comunidad microbiana del ciego de pollos* (Choct, datos no publicados)

	Maíz	Sorgo	Cebada	Avena	Centeno
<i>Bifidobacterium</i>	-	-			
<i>Enterococcus</i>	+	+			
<i>Lactobacillus</i>			+		
<i>Escherichia</i>				+	
<i>Lactococcus</i>				+	
<i>Streptococcus</i>					+
Desconocidos					-

*Los símbolos +/- indican la dirección de los cambios bacterianos estadísticamente significativos (P<0,05).

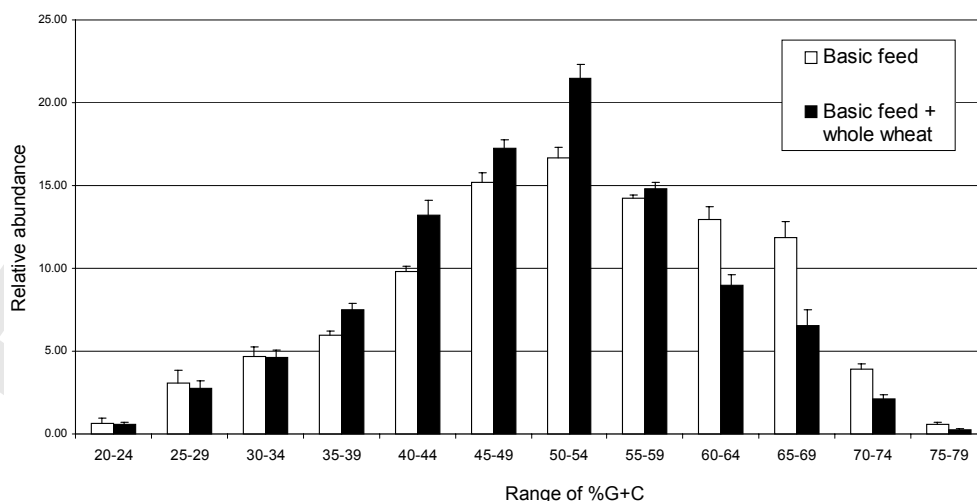
Los pollos alimentados con maíz y sorgo mostraron una menor abundancia de bífidobacterias que las aves alimentadas con las otras dietas. Hemos mostrado previamente (figura 6) que, con respecto a dietas basadas en trigo, las dietas basadas en maíz suprimen

las bacterias con porcentaje de G+D entre 60 y 70 (probablemente en su mayoría bífidobacterias). Estos dos trabajos independientes sugieren que el maíz selecciona de forma consistente bacterias distintas de las bífidobacterias tales como los enterococos. El cambio más importante en la flora microbiana observado en este estudio fue la estimulación de estreptococos en la dieta basada en centeno, lo que concuerda con los resultados presentados en la figura 5.

Es una práctica común en muchas granjas suministrar a los pollos trigo entero como suplemento de un pienso compuesto comercial. Hemos estudiado el efecto de esta práctica sobre la estructura de la comunidad bacteriana del ciego de pollos en cuatro granjas de Finlandia que utilizaban el mismo pienso comercial. En dos de estas granjas, el granjero suplementaba el pienso con trigo mientras que en las otras dos los pollos se alimentaban únicamente con pienso compuesto.

El efecto de la suplementación con trigo entero fue estadísticamente significativo (figura 7), estimulando las bacterias con una proporción G+C comprendida entre 35 y 54 y reduciendo la densidad de aquellas con una proporción de G+C entre 60 y 69. Parece entonces que cuando el trigo se incluye en un pienso compuesto estimula el crecimiento de bífido- y fusobacterias pero cuando se suministra como un suplemento de trigo entero deprime a estos mismos grupos bacterianos. Es posible que la molienda y procesado del trigo afecte a sus características como modulador microbiano.

Figura 7.- Efecto de la suplementación con trigo entero sobre la composición de la flora cecal en pollos



Hemos observado recientemente que piensos compuestos procedentes de diferentes fabricantes favorecen a diferentes bacterias en el tracto digestivo de los pollos (Apajalahti et al., 2001). Esto es especialmente interesante por el hecho de que los fabricantes usaban prácticamente los mismos ingredientes alimenticios. Esto sugiere que el procesado (temperatura, presión, etc) afecta significativamente las características de los alimentos como sustratos de la flora microbiana.

5.- DESAFIOS PARA EL FUTURO

En la actualidad no es posible establecer el significado fisiológico de todos los cambios microbianos detectados por los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, la disponibilidad de métodos relativamente rápidos para monitorizar las comunidades bacterianas es un prerrequisito para encuestas epidemiológicas futuras. El tipo de datos mostrados en este trabajo pueden ser correlacionados con otros parámetros que reflejen los rendimientos y la salud de los animales y contribuir a mejorar de manera importante nuestros conocimientos sobre las interacciones gastrointestinales y la importancia de la estructura de la comunidad microbiana.

6.- REFERENCIAS

- AL-SHEIKHLY, F. y AL-SAIEG, A. (1980) *Avian Diseases* 24: 324-333.
- AMANN, R.I., LUDWIG, W. y SCHLEIFER, K.H. (1995) *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- ANTONIOU, T. y MARQUARDT, R.R. (1981) *Poultry Science* 60: 1898-1904.
- APAJALAHTI, J.H., SARKILAHTI, L.K., MAKI, B.R., HEIKKINEN, J.P., NURMINEN, P.H. y HOLBEN, W.E. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4084-4088.
- APAJALAHTI, J.H.A., KETTUNEN, A., BEDFORD, M.R. y HOLBEN, W.E. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5656-5667.
- APAJALAHTI, J.H.A., KETTUNEN, H., KETTUNEN, A., HOLBEN, W.E., NURMINEN, P.H., RAUTONEN, N. y MUTANEN, M. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4986-4995.
- BEDFORD, M.R. y CLASSEN, H.L. (1992) *J. Nutr.* 122: 560-569.
- BEDFORD, M.R., CLASSEN, H.L. y CAMPBELL, G.L. (1991) *Poultry Science* 70: 1571-1577.
- BOROS, D. (1998) *J. Anim. Feed Sci.* 7: 323-331.
- BROUSSARD, C.T., HOFACRE, C.L., PAGE, R.K. y FLETCHER, O.J. (1986) *Avian Diseases* 30: 617-619.
- CAMPBELL, G.L., ROSSNAGEL, B.G. y BHATTY, R. (1993) *Anim. Feed Sci. Technol.* 41: 191-197.
- CAMPBELL, G.L., ROSSNAGEL, B.G., CLASSEN, H.L. y THACKER, P.A. (1989) *Anim. Feed Sci. Technol.* 26: 221-230.
- CLASSEN, H.L., CAMPBELL, G.L., ROSSNAGEL, B.G., BHATTY, R.S. y REICHERT, R.D. (1985) *Can. J. Anim. Sci.* 65: 725-733.
- COATES, M.E. (1986) *Br. Poult. Sci.* 27: 3-10.
- CRESCI, A., ORPIANESI, C., SILVI, S., MASTRANDREA, V. y DOLARA, P. (1999) *J. Applied Microbiol.* 86: 245-250.
- FELSKE, A., AKKERMANS, A.D.L. y DE VOS, W.M. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4588-4590.
- FENGLER, A.I. y MARQUARDT, R.R. (1988) *Cereal Chemistry* 65: 298-302.
- FRITSCH, T.R., HORN, M., SEYEDIRASHTI, S., GAUTOM, R.K., SCHLEIFER, K.H. y WAGNER, M. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 206-212.
- FULLER, R., HOUGHTON, S.B. y COATES, M.E. (1983) *Br. Poult. Sci.* 24: 111-114.
- GARRIGA, M., PASCUAL, M., MONFORT, J.M. y HUGAS, M. (1998) *J. Appl. Microbiol.* 84: 125-132.
- GIBSON, G.R., WILLEMS, A., READING, S. y COLLINS, M.D. (1996) *Proc. Nutr. Soc.* 55: 899-912.

- GUSILS, C., CHAIA, A.P., GONZALEZ, S. y OLIVER, G. (1999) *Journal of Food Protection* **62**: 252-256.
- HANSON, R.S. y HANSON, T.E. (1996) *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
- HILLMAN, K. (1999) En: *Proc. WPSA Spring Meeting, Scarborough*. pp.59-61.
- HOCK, E., HALLE, I., MATTHES, S. y JEROCH, H. (1997) *Agribiological Research-Zeitschrift für Agrarbiologie Agrikulturchemie Ökologie* **50**: 85-95.
- HOFSHAGEN, M. y KALDHUSDAL, M. (1992) *Poultry Science* **71**: 959-969.
- HOLBEN, W.E., NOTO, K., SUMINO, T. y SUWA, Y. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2528-2532.
- HOLBEN, W.E., SARKILAHTI, L.K., WILLIAMS, P., SAARINEN, M. y APAJALAHTI, J.H.A. (2002) *Microb. Ecol.* **44**: 175-185.
- IZAT, A.L., HIERHOLZER, R.E., KOPEK, J.M., ADAMS, M.H., REIBER, M.A. y MCGINNIS, J.P. (1990) *Poultry Science* **69**: 2244-2247.
- JATILA, H.L., OKSANEN, J.T., KETTUNEN, H. y APAJALAHTI, J.H.A. En: *Proceedings of Anaerobe 2000*. Ref Type: Conference Proceeding
- JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N., ALI, M.A. y JALALUDIN, S. (1998) *Anim. Feed Sci. Technol.* **70**: 197-209.
- KLEESSEN, B., HARTMANN, L. y BLAUT, M. (2001) *Br. J. Nutr.* **86**: 291-300.
- MAIDAK, B.L., COLE, J.R., LILBURN, T.G., PARKER, C.T., SAXMAN, P.R., FARRIS, R.J., GARRITY, G.M., OLSEN, G.J., SCHMIDT, T.M. y TIEDJE, J.M. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**: 173-174.
- MEAD, G.C. y ADAMS, B.W. (1975) *Br. Poult. Sci* **16**: 169-176.
- OHKUMA, M. y KUDO, T. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 461-468.
- PERSIA, M.E., DEHORITY, B.A. y LILBURN, M.S. (1999) *Poultry Science Abstracts* **78**: 16.
- REID, C.A. y HILLMAN, K. (1999) *Animal Science* **68**: 503-510.
- SAVORY, C.J. (1992) *Br. J. Nutr.* **67**: 91-102.
- SCOTT, T.A., SILVERSIDES, F.G., CLASSEN, H.L., SWIFT, M.L. y BEDFORD, M.R. (1998) *Canadian Journal of Animal Science* **78**: 649-656.
- SUAU, A., BONNET, R., SUTREN, M., GODON, J.J., GIBSON, G.R., COLLINS, M.D. y DORE, J. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4799-4807.
- WAGNER, D.D. y THOMAS, O.P. (1987) *Poultry Science* **57**: 971-975.
- WILLIAMS, R.B., CARLYLE, W.W., BOND, D.R. y BROWN, I.A. (1999) *Int. J. Parasitol.* **29**: 341-355.